Aus dem Klinisch-Chemischen Labor
(Leiter: Prof. Dr. T. O. Kleine)
der Universitäts-Nervenklinik Marburg/Lahn
(Komm. Direktor: Prof. Dr. H. Solcher)

NEUER SIMULTANER PROTEINBINDUNGSASSAY FÜR CYCLISCHES ADENOSIN-3',5'-MONOPHOSPHAT UND CYCLISCHES GUANOSIN-3',5'-MONOPHOSPHAT

ANWENDUNG ZUR MESSUNG DER CYCLISCHEN NUCLEOTIDAUSSCHEIDUNG IM MENSCHLICHEN URIN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

UDO KROH
aus Ziegenhain

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Klinisch-Chemischen Labor
(Leiter: Prof. Dr. T. O. Kleine)
der Universitäts-Nervenklinik Marburg/Lahn
(Komm. Direktor: Prof. Dr. H. Solcher)

NEUER SIMULTANER PROTEINBINDUNGSASSAY FÜR CYCLISCHES ADENOSIN-3',5'-MONOPHOSPHAT UND CYCLISCHES GUANOSIN-3',5'-MONOPHOSPHAT

ANWENDUNG ZUR MESSUNG DER CYCLISCHEN NUCLEOTIDAUSSCHEIDUNG IM MENSCHLICHEN URIN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

UDO KROH

aus Ziegenhain

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 15. 12. 1978

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan : Prof. Dr. Fr. Neurath
Referent : Prof. Dr. T.O. Kleine
Coreferent : Prof. Dr. G.Sturm

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546009_0090

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	4
2.	MATERIAL UND METHODIK	7
2.1.	Liste der verwendeten Abkürzungen	7
2.2.	Material	9
2.2.1.	Chemikalien	9
2.2.2.	Radioaktive Substanzen	9
2.2.3.	Apparate	1o
2.2.4.	Lösungen und Puffer	11
2.3.	Methodik	12
2.3.1.	Proteinbestimmung nach LOWRY	12
2.3.2.	Reinigung von Norit A^3	12
2.3.3.	Reinigung von Albumin nach CHEN	13
2.3.4.	Genereller Ansatz für Bindungstests	13
2.3.5.	Ergebnisberechnung,Statistik	15
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	17
3.1.	Isolierung,Identifizierung und Charakterisierung von cAMP-bindendem Protein	17
3.1.1.	Präparation von Bindungsprotein aus Rinderskelettmuskel	17
3.1.2.	Identifizierung von cAMP-bindendem Protein aus Rinderskelettmuskel	19
3.1.3.	Anreicherung und Charakterisierung von cAMP-bindendem Protein aus Rinderskelettmuskel	22

Seite

3.2.	Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von cGMP-bindendem Protein	23
3.2.1.	Präparation von Bindungsprotein aus Hummermuskel	23
3.2.2.	Anreicherung und Charakterisierung von cGMP-bindendem Protein aus Hummermuskel	25
3.3.	Erstellung der Bedingungen für einen simultanen Bindungsassay für cAMP und cGMP	27
3.3.1.	Ermittlung der optimalen Pufferzusammensetzung	27
3.3.2.	Erstellung der optimalen Bindungsverhältnisse im Doppeltest	27
3.3.3.	Ansatz für den simultanen Bindungsassay für cAMP und cGMP	35
3.3.4.	Interferenzen von verwandten Substraten im cAMP-und cGMP-Bindungstest	35
3.4.	Simultane Messung von cAMP und cGMP im menschlichen Urin	43
3.4.1.	Uringewinnung und Probenvorbereitung	43
3.4.2.	Genauigkeit des Doppelbindungstests für Urinproben	43
3.4.3.	Präzision	44

		Seite
3.4.4.	Spezifität	44
3.4.5.	Vergleich der cAMP-und cGMP-Konzentrationen im menschlichen Urin	47
3.4.5.1.	24h-Ausscheidung von cAMP und cGMP	47
3.4.5.2.	Circadiane Ausscheidung von cAMP und cGMP	49
4.	ZUSAMMENFASSUNG	52
5.	LITERATURVERZEICHNIS	54

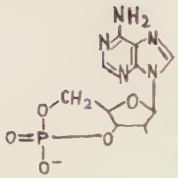
1. EINLEITUNG

Seit der Entdeckung der Schlüsselfunktion der cyclischen Nukleotide für den Intermediärstoffwechsel durch SUTHERLAND (71) hat eine stürmische Entwicklung auf dem Gebiet der cAMP-Forschung eingesetzt.

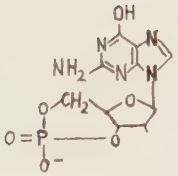
Zahlreiche Einzel-und Übersichtsarbeiten über diesen sogenannten "second messenger" von Nicht-Steroidhormonen und von Sympathomimetika sind erschienen und führten zu einer wesentlich neuen Erkenntnis der subzellulären Vorgänge.

Neben den bekannten Kaskadenreaktionen der Proteinkinasen bei Glycogenolyse und Lipolyse ("first messenger": Adrenalin, Glucagon) sind inzwischen die Mediation von ACTH, PTH,TSH und weiterer Proteohormone sowie von Neurotransmittern mittels cyclischer Nucleotide wahrscheinlich (27).

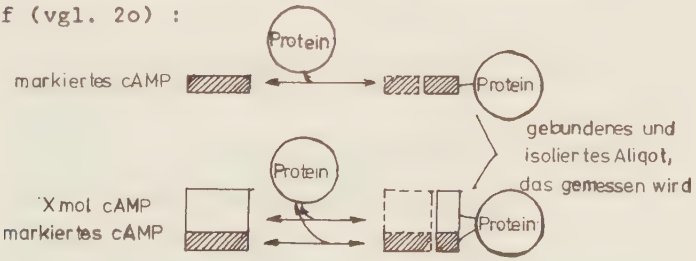
cGMP, bereits von SUTHERLAND erwähnt, ist das einzige weitere cyclische Nucleotid, das im menschlichen Körper bisher gefunden wurde. Tierversuche (21,33) und in vitro-Tests (35,45) weisen auch hier über die Spekulationsphase hinaus auf " second messenger"-Funktion sowie - parallel zum cAMP auf direkte Einwirkungen auf den Elektrolythaushalt hin (16,19,42,44,53,7o,74,8o,81). Synergismen und Antagonismen von



cAMP und cGMP



führten zu einer Synopse als Yin Yang-Theorie der biologischen Regulation (25).
Eine Reihe von Publikationen weist auf eine "ergotrope" Wirkung von cAMP (14,27,28,29,3o,32,34,45,47,59,6o,61, 69, 73,75,84,89) und auf eine "trophotrope" Wirkung von cGMP (5,25,33,35,74,89) hin.
Hieraus folgt, daß Substratbestimmungen - wenn überhaupt- hier nur gleichzeitig für beide cyclischen Nucleotide sinnvoll sind.
Ähnlich groß wie die Zahl der Untersuchungen über cAMP und cGMP sind die Bestimmungsmethoden : Enzymatische (12), radioimmunologische (62,68,76) und Rezeptorproteinbindungstests (1,13,18,22,23,48,52,55,63,65,67,78,83,85,86,9o) konkurrieren, wobei den beiden letzteren der Vorzug gegeben wird.
Proteinbindungstests wurden aus Rinderskelettmuskel, Rindernebenniere, Kaninchenmuskel und Arthropodengewebe (Hummer, Seidenraupe) entwickelt (s.o.).
Folgendes Reaktionsschema verdeutlicht den prinzipiellen Versuchsablauf (vgl. 2o) :



Diese Arbeit soll die simultane Bestimmung von cAMP und cGMP im Beta-Counter bei einer erheblichen Zeitersparnis mittels eines neuen hochmarkierten [^{14}C] - cAMP und [^{3}H]-cGMP beschreiben.
Sie weist die gleiche Genauigkeit wie Einfachbindungstests auf, wenn ein an natürliche Bedingungen adaptiertes Verhältnis der Standardkurven und Auswertung durch EDV zur Anwendung kommen. Leichte Erweiterung auf Plasma- und Gewebeextraktbestimmung ist möglich (1,13,18,22,48, 52, 63, 65,67,78,83,87).

Obwohl in der Literatur zum Teil widersprüchliche Aussagen über den Wert von Urinbestimmungen von cAMP und cGMP gemacht werden (8,1o,11,17,26,33,49,57) , bewog gerade dies dazu, den vorliegenden Simultantest zu entwickeln : billiger, praktikabler, geringerer zeitlicher und personeller Aufwand. Als Anwendungsbeispiele sollten hier 24h-Urinwerte und Circadianwerte ermittelt und mit Ergebnissen vergleichbarer Arbeiten korreliert werden.

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1. Liste der verwendeten Abkürzungen

ADP : Adenosin-5'-diphosphat;

A-5-MP : Adenosin-5'-monophosphat;

cA-2,'3'-MP : cyclisches Adenosin-2',3'monophosphat;

cAMP : cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat;

ATP : Adenosin-5'-triphosphat;

8-Benz-cAMP : 8-Benzylamino-Adenosin-3',5'-monophosphat cyclisch;

8-Br-cAMP : 8-Brom-Adenosin-3',5'-monophosphat cyclisch ;

8-Br-cGMP : 8-Brom-Guanosin-3',5'-monophosphat cyclisch ;

8-Br-cIMP : 8-Brom-Inosin-3',5'-monophosphat cyclisch;

5-Br-dUTP : 5-Brom-Desoxyuridine-5'-triphosphat;

cCMP : cyclisches Cytidin-3',5'-monophosphat;

cC-2',3'-MP : cyclisches Cytidin-2',3'-monophosphat;

cdAMP : cyclisches 2'-Desoxyadenosin-3',5'-monophosphat

diBucAMP . N^6-2'-O-Dibutyryl-Adenosin-3',5'-monophosphat ; cyclisch

diBucGMP : N^2-2'-O-Dibutyryl-Guanosin-3',5'-monophosphat cyclisch;

EDTA : Titriplex III (Aethylen diamintetraessigsäure;

g : Gramm oder Erdbeschleunigung 9.81 m/s^2;

GDP : Guanosin-5'-diphosphat;

G-5-MP : Guanosin-5'-monophosphat;

cGMP : cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat;

cG-2',3'-MP : cyclisches Guanosin-2',3'-monophosphat;

GTP : Guanosin-5'-triphosphat;

cIMP : cyclisches Inosin-3',5'-monophosphat;

ITP : Inosin-5'-triphosphat

moBucAMP : N^6-Monobutyryl-Adenosin-3',5'-monophosphat, cyclisch;

moBucIMP : 2'-O-Monobutyryl-Inosine-3',5'-monophosphat, cyclisch ;

moBuUMP : 2'-O-Monobutyryl-Uridin-3',5'-monophosphat cyclisch;

SQ 2o.oo9 : (1-ethyl-4-isopropylidene-hydrazino) -1H-pyrazolol (3,-4-b) pyridine-5-carboxylic acid ;

TCE : Trichloressigsäure ;

THAM : Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan;

cdTMP : cyclisches 2'-Desoxythymidin-3', 5'-monophosphat;

UTP : Uridin-5'-triphosphat;

cXMP : cyclisches Xanthosin-3',5'-monophosphat;

2.2 MATERIAL

Zur Isolierung und Identifizierung der Bindungsproteine sowie zur Einstellung des Tests wurden folgende Chemikalien, radioaktive Substanzen, Apparate, Lösungen und Puffer verwendet :

2.2.1. Chemikalien: Wenn nicht anders vermerkt, waren sämtliche Substanzen pro analysi, (p.a.) . Von E. Merck, Darmstadt : Ammoniumsulfat, Calziumsulfat, konz. Essigsäure, Folin-Ciocalteus-Reagenz, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumhydroxid, Kaliumnatriumtartrat, Kupfersulfat, Magnesiumsulfat, Natriumcarbonat, 1-N-Natronlauge, 1N-Salzsäure, Theophyllin rein, Titriplex III, Titrisol-Eichlösung, Trichloressigsäure, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan ; von Serva Feinbiochemica, Heidelberg : 2-Mercapto-aethanol (reinst); von SQUIBB Institute for Medical Research, Princeton New Jersey: SQ 2o.oo9; von C.F. Boehringer, Mannheim: cyclische Nucleotide, Nucleotide, Nucleoside und deren Basen; von den Behringwerken, Marburg : Serum Albumin v. Rind, reinst; von Norit Clydesdale, Glasgow, UK : Norit A^3; von Whatman DE 11, Diethylaminoethyl Cellulose (DEAE Cellulose); von Calbiochemicals, Los Angeles : ITP.

2.2.2. Radioaktive Substanzen : [adenine-U-^{14}C] Adenosine 3',5'-cyclic phosphate Ammonium salt, 287mCi/mmol, (MG 329) 25 µCi/ml, (Amersham Buchler & Co KG,Braunschweig); [ribose-5-^{3}H] Guanosine 3',5'-cyclic phosphate Ammonium salt, 31 Ci/mmol, (MG 362), 1mCi/ml; [8-^{3}H] Guanosine 3',5' cyclic phosphate Ammonium salt, 21 Ci/mmol, (MG345), 1 mCi/ml; Adenosine 3', 5'-cyclic phosphate Ammonium salt [^{3}H(G)] , 38,4 Ci/mmol, (MG 346,3), 1 mCi/2.2 ml, New England Nuclear (NEN).

2.2.3. Apparate : von E. Bühler, Tübingen : Homogenisator, Messer-DM 3 cm, 15o ml-Gefäße ; von WKf Gesellschaft für Elektrophysikalischen Apparatebau, Brandau b. Darmstadt : WKf-Kühlzentrifuge G5oK mit Festwinkelrotoren 6x25o ml und 6 x 1ooo ml, Edelstahlbecher ; von LKB, Frankfurt: Kühlmantelsäule 6o x 2,2 cm, Fraktionssammler Ultrorac 7ooo mit Uvicord-Control Einheit Type 47o1 (Wellenlänge 28o nm); von Eppendorf Hamburg: Mikrolitersystem mit Tischzentrifuge, Probe-Reagenz-Dosierer 5232/52 Photometer; von C. Zeiss, Oberkochen: Spektralphotometer PM Q II; von B.Braun Melsungen: Mini Shaker Modell Rührer; von Hamilton, Hamburg: Mikropipettensystem; von G. Wilke, Hamburg ; Synthetik-Inkubationsröhrchen, 4 x 1 cm mit Lamellenstopfen; von W. Zinsser, Frankfurt/M: Unisolve 1-Scintilator, Zählgefäße; von Packard Instruments GmbH, Frankfurt: Liquid Scintilation Spectrometer TRI-CARB 338o mit Automatic Model 544; von Diehl Rechenmaschinen, Nürnberg: Diehl combitron S; von Hewlett-Packard, Böblingen: Tischcomputer 9815 A mit Programmkassetten für die Berechnung der Ergebnisse; aus den Werkstätten des Fachbereichs 2o, Universität Marburg: Arbeitsgestelle für 8o und 18o Testplätze, Rotoreinsätze für 6 x 12 und 6 x 29 Plätze.

2.2.4. Lösungen und Puffer (Kühlung sämtlicher Flüssigkeiten und Geräte vor Gebrauch auf 4°C): zur Extraktion der Bindungsproteine: EDTA 4mmol/l, eingestellt auf pH 7.o mit 1-N-KOH (Med.A) ; KH_2PO_4 1 mmol/l, eingestellt auf pH 7.2 mit 1-N-KOH (Med.B) ; KH_2PO_4 5mmol/l und EDTA 2mmol/l, eingestellt auf pH 7.o mit 1-N-KOH (Med.C); analog mit jeweils 2 mmol/l EDTA und pH 7.o: KH_2PO_4 5o mmol/l (Med. D); KH_2PO_4 1oo mmol/l (Med.E); KH_2PO_4 2oo mmol/l (Med.F) KH_2PO_4 3oo mmol/l (Med. G)
Zur Proteinbestimmung nach LOWRY (51): $CuSO_4$ x 5 H_2O 4o mmol/l (Lösung A_1), K-Na-Tartrat 7o mmol/l (Lösung A_2), Na_2CO_3 19o mmol/l (Lösung B); am Versuchstag wurden gemischt: 1 Teil Lösung A_1 mit 1 Teil Lösung A_2 (Lösung A), anschließend 1 Teil Lösung A mit 5o Teilen Lösung B (LOWRY-Reagenz) zur sofortigen Verwendung; 1 Teil Folin-Ciocalteus-Reagenz mit 1 Teil Aqua bidest. gemischt (Folin-Reagenz).
Zur Identifizierung der Bindungsproteine und zur Einstellung des Tests : THAM 5o mmol/l, Theophyllin 8 mmol/l, 2-Mercaptoaethanol 6 mmol/l, eingestellt auf pH 7.4 mit 1-N-HCl (Puffer nach BROWN (13, P1), THAM 18o mmol/l, Theophyllin 16 mmol/l, 2-Mercaptoaethanol 12 mmol/l (P2) THAM 18o mmol/l, SQ 2o.oo9 9o mg/l, 2-Mercaptoaethanol 12 mmol/l (P3); THAM 18o mmol/l, SQ 2o.oo9 9o mg/l, 2-Mercaptoaethanol 12 mmol/l, $MgSO_4$ 8o mmol/l (P4), THAM 18o mmol/l, SQ 2o.oo9 9o mg/l, 2-Mercaptoaethanol 12mmol/l, $CaCl_2$ 36 mmol/l (P5); THAM 12o mmol/l (P6); THAM 12o mmol/l, SQ 2o.oo9 6o mg/l, 2-Mercaptoaethanol 8 mmol/l, $MgSO_4$ 6o mmol/l (P7); pH jeweils eingestellt auf 7.4 mit 1-N-HCl.
Die Angabe weiterer Lösungen ergeht aus dem Text.

2.3. METHODIK

2.3.1. Proteinbestimmung nach LOWRY (51)

Vorbereitung der Proben : Ausfällen und Lösen der Proteine im Eppendorf-Mikroliter-System: Aliquots der Zentrifugate und der Säulenfraktionen sowie Standardverdünnungen von Serum-Albumin vom Rind o.2 g/l in P6 wurden mit gleichen Mengen o.6 M/l TCE in der Kälte gefällt und für 2 min bei 15ooo g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Sedimente wurden für 24 Stunden bei Zimmertemperatur in 1 mol/l 1N-Natronlauge gelöst (alkalische Proteinlösung).

Lösungen s. 2.2.4.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Ansatz :

o.1 ml alkalische Proteinlösung (z.T. weiterverdünnt) gemischt mit 1 ml Lowry-Reagenz nach 1o min Zugabe von o.1 ml Folin-Phenolreagenz und Inkubation für 3o min bei Zimmertemperatur. Messung der Extinktion bei 75o nm und 2 cm Schichtdicke gegen Luft. Die Eichkurve verlief linear zwischen 2 und 2o µg Albumin pro Ansatz mit einem Variationskoeffizienten von V_k= 9.1 %.

1o µg Albumin/Ansatz entsprachen o.359 E.

2.3.2. Reinigung von Norit A

1oo g der Kohle wurden in 5 l Aqua bidest gewaschen, bei 78oo g zentrifugiert und bei + 4o°C im Brutschrank getrocknet.

2.3.3. Reinigung von Albumin nach CHEN (15)

2o g Des Serum-Albumin vom Rind wurden in 2oo ml Aqua bidest bei 24.5 °C gelöst. Zugabe von 1o g der unter 2.3.2. gereinigten Norit A-Kohle. Der pH wurde nach vorheriger Eichung des pH-Meters mit Titrisol 3.o ± o.o2 duch Zugabe von o.2N-HCl (ca. 4oo ml) auf 3.o eingestellt. Die Lösung wurde 1h mit dem Magnetrührer im Eisbad gerührt. Durch zweimaliges Zentrifugieren bei 2ooo g (161oo Upm,r=6.8 cm) und 2°C wurde die Kohle entfernt. Die klare Lösung wurde durch Zugabe von o.2N-NaOH auf pH 7.o gebracht und anschließend gegen Aqua bidest dialysiert um die anorganischen Ionen zu entfernen.

2.3.4. Genereller Ansatz für Bindungstests

In der auf +4°C eingestellten Kühltruhe wurde pro Inkubationsröhrchen pipettiert:

2o µl P7 (s.2.2.4.)
2o µl Standard oder Probe verdünnt in P7
1o µl Tracer in P7
5o µl Proteinpräparation in P6

Nach Inkubation in der Kälte für 18o min mit Schütteln auf dem Mini-Shaker bei ca. 3oo Upm wurden in die Lamellenstopfen der Röhrchen 1og/l Albumin gereinigt nach CHEN (s.2.3.3.) und 3o g/l gereinigte Norit Aktivkohle in P7 zu je 5o µl pipettiert. Die Stopfen wurden, ohne daß es zu einem Abtropfen der Suspension in die Inkubate kam, auf die Röhrchen gesteckt. Eine Abdeckplatte verschloß das Arbeitsgestell. Jetzt wurde durch mehrmaliges Beklopfen der Abdeckplatte und des Bodens des Arbeitsgestells ein simultanes Vermischen der Kohlesuspension mit dem Inkubat erreicht, die Bindungsreaktion abgestoppt und die überschüssigen freien Nukleotide an die Kohle absorbiert.

Genereller Ansatz für Bindungstests

		Leerwert	1oo%-Wert	Standard	Probe	Wiederauffindung
1	P7 (2.2.4.)	4o	4o	2o	2o	--
2	Tracer in P7 (2.2.2.)	1o	1o	1o	1o	1o
3	Standard	--	--	2o	--	2o (2 bzw. 2o pmol)
4	Probe(s. Text)	--	--	--	2o	2o
5	P6 (2.2.4.)	5o	--	--	--	--
6	Proteinfraktion	--	5o	5o	5o	5o
	18o min Inkubation bei 4°C auf Mini Shaker					
7	1og/l Albumin n. CHEN(2.3.3.)in P7	--	5o	--	--	--
8	7. + 3og/l Norit-Aktivkohle(2.3.2.)	5o	--	5o	5o	5o

Jeweils mindestens Dreifachwerte. Weitere Einzelheiten s. Text.

Nach kurzem Mischen wurde die Kohle bei 5000 Upm=4000g für 2o min abzentrifugiert und ein Aliquot von je 75 µl des Überstandes in die Scintigel gefüllten Zählgefäße überführt.
Dabei enthielt jedes Zählgefäß neben 1o ml Unisolve 1 noch 4oo µl Aqua bidest zur Stabilisierung. Die Auszählung (d.p.m.) erfolgte im Tri-Carb Scintillationsspektrometer,wobei nach Vorzählung und nach Abklingen der Eigenfluoreszenz jede Probe 3 x 1o min gezählt wurde.
Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Für die Auswertung enthielt jeder Test Leerwerte, die anstelle der Proteinpräparation lediglich Pi-Puffer enthielten, und sog. 1oo % - Werte, bei denen nur Albuminlösung in die Stopfen gegeben wurde. Ein übersichtliches Ansatzschema wird auf Seite 14 gegeben .

2.3.5. Ergebnisberechnung,Statistik

In den Versuchen wurden Doppel-bzw. Dreifachwerte für die Standardreihen angesetzt. Die Leerwerte wurden gemittelt, von den Standards subtrahiert und in einem Doppelt-logarithmischer Maßstab (2o,23,55) aufgetragen. Für die Bestimmung der Analogsubstanzen wurde ein Einfach-logarithmischer Maßstab verwendet (13). Für die prozentuale Hemmung wurde die Standardabweichung S_n der gefundenen Werte aus den Mehrfachbestimmungen nach der Formel

$$S_n = \sqrt{\frac{\sum(\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}}$$

bestimmt und mit dem Mittelwert $\bar{x} = \frac{x_i}{n}$ angegeben.

Die Standardabweichung von Tag zu Tag S_m bzw. in der Serie S_S wurde nach folgenden Formeln berechnet:

$$S_T = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$S_S = \sqrt{\frac{\sum (x_i' - x_i'')^2}{2\ m}}$$

Der Variationskoeffizient in Prozent V_k (%) wurde berechnet nach

$$V_k(\%) = \frac{\text{Standardabweichung x 1oo}}{\text{Mittelwert}} .$$

Dabei bedeuten :

n = Anzahl der Werte

x_i = Summe der einzelnen Meßergebnisse

m = Anzahl der Wertpaare

Für den Doppelbindungstest im Urin mit Wiederauffindung, Richtigkeit und Präzision wurde ein Rechenprogramm erstellt: zunächst Mitteilung und Subtraktion der Leerwerte, Berechnung der Standardkurve aus den vorliegenden Werten anhand einer linearen Regressionsgeraden nach der Formel $y = a+bx$ (diese mußte zunächst logarithmiert und für die Ergebnisablesung wieder delogarithmiert werden, da Linearität nur im Doppellog.-Maßstab gegeben ist).
Angegeben wurden Standardabweichungen der Proben, Steigung der Kurve, Koeffizeint der Regressionsgeraden und Einzelwerte der Ergebnisse. Abweichungen 1o % vom Mittelwert wurden eliminiert, um eine Verfälschung der Probenwerte zu vermeiden (2o).

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1. Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von cAMP-bindendem Protein (modifiziert nach MIYAMOTO et al. (53) und GILMAN et al. (23)

3.1.1. Präparation von Bindungsprotein aus Rinderskelettmuskel

Alle Schritte wurden bei 2°C durchgeführt.
5oo g Kalbsnacken wurden unmittelbar nach Tötung des Tieres auf Eis gelegt und bei -2o°C eingefroren. Die Aufarbeitung erfolgte am nächsten Morgen : das Fleisch wurde zunächst im Kühlraum mit Schere und Pinzette von makroskopisch sichtbarem Binde-und Fettgewebe befreit und auf ca. o.5 cm große Stücke zerkleinert.Diese wurden im Verhältnis 1:4 mit Medium A im Bühler-Homogenisator bei 1o ooo bis 15 ooo Upm für 15" mit 15" Pause insgesamt je 1o min unter Kühlung homogenisiert. Anschließend Überführung der Homogenate in die Gefäße des 6 x 25o ml Rotors und Zentrifugation für 2o min bei 16 ooo Upm (=27 ooo g am Oberrand des Rotors bzw.42 3oo g am Unterrand). Vom Überstand (pH 6.45) wurden 2 Aliquots von je 5 ml entnommen und eingefroren, bzw. gekühlt aufbewahrt für die Bindungsbilanz. Der Rest wurde tropfenweise mit 1-N Essigsäure versetzt und auf pH 4.8 gebracht, das Präzipitat durch Pezentrifugation bei 16 ooo Upm für 3o min entfernt und vom Überstand erneut 2 Aliquots von je 5 ml entnommen.

Nach Einstellung des Überstandes mit Medium B auf pH 6.5 erfolgte die Ammoniumsulfatpräzipitation mit o.325 g $(NH_4)_2SO_4$ pro ml : langsame Zugabe des feingemörserten Pulvers unter ständigem Umrühren für 3o min. Anschließend wurde der Überstand bei 12 2oo Upm (= 16 ooo g am Oberrand) für 2o min abzentrifugiert und das Präzipitat in 6 % des Rohextraktes mit Medium C über Nacht resuspendiert; Entnahme zur Bilanzierung von Überstand und Niederschlag von je 2 x 5 ml bzw. 2 x 1 ml. Das Präzipitat wurde gegen 1.5 l Medium C,

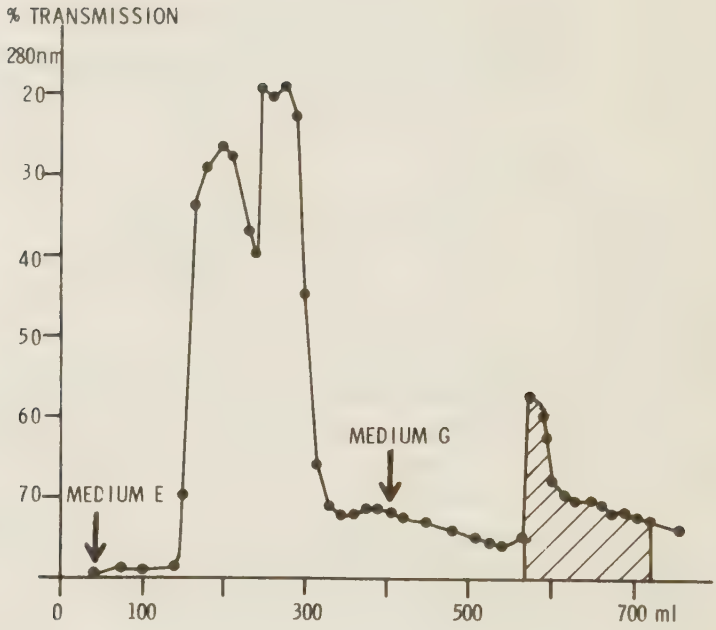


Abb. 1. DEAE-Cellulose-Chromatographie der Rinderskelettmuskelpräparation. Auftragung in Prozent Transmission 280 nm gegen Volumen Eluat. Der schraffierte Anteil entspricht der im Doppeltest verwendeten Proteinfraktion D VI aus Tab.1. Die übrigen Fraktionsbezeichnungen D I - D V wurden hier zur besseren Übersicht weggelassen. ↓ = Zugabe des unter 2.2.4. beschriebenen Eluatmediums.

mit zweimaligem Wechsel des Puffers dialysiert (Spectrapor Membrane tubing, Chicago, USA). Vom Dialysat wurden 5 ml Aliquot entnommen.
Der Rest wurde auf eine mit Medium C äquilibrierte DEAE-Cellulosesäule gegeben (Volumen : 21o cm^3) und mit Medium E, 5oo ml, danach Medium G, 5oo ml, eluiert.
Die in LKB-Fraktionssammler Ultrorac 7ooo isolierten Fraktionen konnten bei 28o nm photometrisch als zwei Peaks unterschiedlicher Transmission identifiziert werden. Da sich Peak 1 (Abb.1) offensichtlich aus mehreren Untereinheiten zusammensetzte, wurden insgesamt 6 Fraktionen gebildet. Diese und die Aliquots der Zentrifugate wurden nach Dialyse (für 6 Stunden in Aqua bidest. 24 Stunden in Medium C und 48 Stunden in P6) in 1 bis 1o ml Portionen bei -4o°C eingefroren.

3.1.2. Identifizierung von cAMP-bindendem Protein aus Rinderskelettmuskel

Als erstes wurde nach dem vorgegebenen Versuchsschema die Identifizierung des spezifisch cAMP-bindenden Proteins durchgeführt. Zur Vermeidung von Überlagerungseffekten (2o) bei zu hohen Proteinkonzentrationen wurden Verdünnungsreihen für die Aliquots der einzelnen Präparationsschritte hergestellt, und deren Bindungskapazität für cAMP bei einer Konzentration von 4o nmol/l (vgl. Gilman) und einer Tracermenge von 1o nmol/l [^{3}H]-cAMP bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.
Mit o.2 pmol/µg cAMP-Bindung erwies sich Peak II als die gesuchte Fraktion.

	Fraktion	Vol.	Protein mg	gebundenes cAMP pmol/µg Protein	gebundenes cGMP pmol/µg Protein
Homogenat-Überstand	R1D	1690	14647	0,0115	
Überstand nach Fäll. mit Essigsäure	R2D	1459	8545	0,0044	
$(NH_4)_2SO_4$ Überstand	R3D	2427	7199	0,00023	
Niederschlag	RPD	85,6	1314	0,0765	
Säulenfraktionen	DI	60	280	0,0002	
	DII	15,5	58,7	0,0081	
	DIII	106	331	0,1457	0,0062
	DIV	122	10	0,0183	
	DV	98	10	0,0065	
	DVI	155	40	0,2152	0,0017

Tab. 1 Isolierung, Anreicherung und Charakterisierung von cAMP-bindendem Protein aus Rinderskelettmuskel

Folgender Ansatz wurde benutzt :

20 µl P7 (2.2.4.)

20 µl Standard mit 1.25 - 320 pmol cAMP, cGMP s. 3.2.2.
entsprechend 12.5 - 3200 nmol/l in P7

10 µl [^{14}C]-cAMP 20 pmol entsprechend
200 nmol/l im Ansatz

50 µl Proteinfraktion

Leerwerte und 100%-Werte waren hergestellt wie beschrieben (2.3.4.). Für die Berechnung wurden außerdem sogenannte I_o-Werte mitgeführt, die anstelle von Standard weitere 20 µl P7 enthielten.

3.1.3. Anreicherung und Charakterisierung von cAMP-bindendem Protein aus Rinderskelettmuskel

Aus Tab 1 geht hervor, daß die Bindungsaffinität für cAMP vom Rohextrakt bis zum Ammoniumsulfatpräzipitat um das ca. 7-fache ansteigt.

Durch die Chromatographie auf DEAE-Cellulose konnte eine weitere Steigerung der Bindungsaffinität festgestellt werden. Es wurden das 3-fache gegenüber dem Präzipitat bzw. das 18.6-fache gegenüber dem Rohextrakt in Fraktion D VI gebunden.
Für die Fraktionen D III und D VI wurden außerdem die Affinitäten für cGMP bestimmt: Fraktion D VI hat eine ca 7-fach geringere Tendenz zur Bindung dieses Nucleotids, und man braucht ca. 19o pmol cGMP, um 1pmol cAMP aus der Bindung an D VI zu verdrängen. Es ergibt sich also insgesamt eine etwa 19-fache Steigerung der Bindungsaffinität für cAMP im Vergleich zum Rohextrakt.
Die Kreuzreaktivität mit cGMP betrug für Fraktion DIII 1:24 und für DVI 1:194.
Damit ergab Fraktion DVI auch im Vergleich mit früheren Untersuchungen von GILMAN (23) und TOVEY (83) das beste Ergebnis und wurde für die spezifische Bindung von cAMP verwendet.

3.2. Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von cGMP-bindendem Protein (modifiziert nach KUO et al.(45)

3.2.1. Präparation von Bindungsprotein aus Hummermuskel

Alle Schritte erfolgten bei + 2°C (3.1.1.).
Lebende Hummer wurden auf Bestellung von einem lokalen Fischgeschäft bezogen, so daß zwischen Fang und Präparation nicht mehr als 48 Stunden vergangen waren. Nach Tötung der Tiere durch Extirpation des Oberschlundganglions wurde die Muskulatur aus Zangen und Schwanzteil freipräpariert und manuell zerkleinert. 498 g Muskulatur wurden im Verhältnis 1:4 mit Medium A im BÜHLER-Homogenisator bei 1o ooo bis 15 ooo Upm für 15" mit 15" Pause, insgesamt je 16 min unter Kühlung homogenisiert. Die Homogenate wurden in den 25o ml-Gefäßen für 2o min bei 16 ooo Upm (= mind. 27 ooo g) zentrifugiert. Von dem Überstand (pH 6.43) wurden 1o ml Aliquot zur Bilanzierung entnommen. Anschließend erfolgte die Säurepräzipitation mit 1-N-Essigsäure auf pH 4.9 und Rezentrifugation bei 16 ooo Upm (s.o.) für 2o min sowie erneute Entnahme von 1o ml Aliquot vom Überstand. Jetzt wurde der pH mit Medium B auf 6.9 eingestellt und mit o.34 g/ml Ammoniumsulfat gefällt. Der Überstand wurde bei 12 2oo Upm (= mind. 16 ooo g,sS) für 2o min abzentrifugiert und davon 1o ml für die Bilanzberechnung entnommen. Das Präzipitat wurde in Med. C gelöst und mit zweimaligem Pufferwechsel gegen dasselbe Medium (ca. 2o-faches Volumen) dialysiert. Von der so gewonnenen Proteinlösung wurden 1,5 ml Aliquot entnommen und der Rest auf eine mit Med. C äquilibrierte DEAE-Cellulose-Säule der Abmessung 54 x 2,2 cm=2o5 cm^3 gegeben.

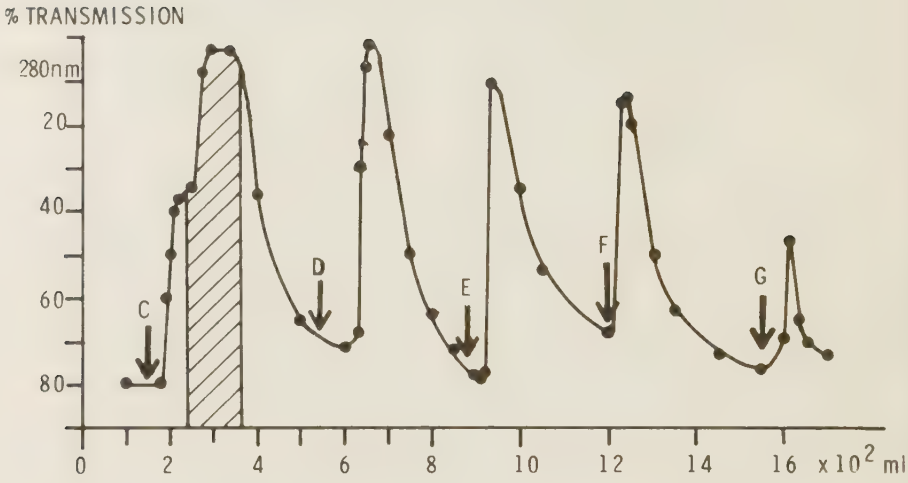


Abb. 2. DEAE-Cellulose-Chromatographie der Hummermuskelpräparation. Auftragung wie in Abb. 1 beschrieben. Schraffiert ist die im Doppeltest verwendete Proteinfraktion P1b und P1c. Die übrigen Säulenfraktionen P1a - P5 sind anhand der Volumenangaben aus Tab. 2 ablesbar.

Bei einer Laufgeschwindigkeit von 37 Tr/min und 15o Tropfen pro Glas wurden stufenweise je 4oo ml der Medien C, D, E, F und G auf die Säule gegeben und die Transmission der Eluate bei 28o nm registriert. Es ließen sich 5 verschiedene Punkte unterscheiden, von denen der erste noch weiter fraktioniert und die übrigen nach Vereinigung gemeinsam untersucht wurden (s.Abb,2).

Die Dialyse der Peaks 2,3,4 und 5 (sowie eines Teils der Aliquots aus Rohextrakt, Säurefällungsüberstand und Ammoniumsulfatüberstand) erfolgte zunächst gegen Aqua bidest, dann gegen Med. C und schließlich gegen P6. Diese Schritte waren für vergleichbare Pufferverhältnisse bei der Bindungsbilanzierung notwendig. Anschließend wurde von den übrigen Aliquots und den Eluaten die Proteinbestimmung nach LOWRY (s. 2.3.1.) durchgeführt.

3.2.2. Anreicherung und Charakterisierung von cGMP-bindendem Protein aus Hummermuskel

Wie aus Abb.2 und Tab. 2 zu ersehen, stellt die in der Ionenaustauschchromatographie gewonnene Fraktion P1 eine Mischfraktion mit unterschiedlich hoher Bindungsaffinität für die untersuchten cyclischen Nucleotide dar. Die im Doppelbindungstest verwendeten Anteile P1b und P1c haben die höchste Affinität für cGMP. Es liegt eine ca. 5-fach geringere Affinität für cAMP vor als in Fraktion P2, die ihrerseits cGMP ca 1o-fach schwächer bindet als P1. Somit scheint durch die DEAE-Cellulose-Chromatographie eine deutliche Trennung von im Hummermuskel nebeneinander vorhandenen Bindungsproteinen für cAMP und cGMP erfolgt zu sein, wobei eine Anreicherung von cGMP-bindendem Protein von mehr als dem 1o-fachen erzielt wurde (Tab 2.) Folgender Ansatz wurde verwendet:

2o µl P7 (2.2.4.)
2o µl Standard mit o.125-32 pmol cGMP, cAMP s.3.1.3.
1o µl [Ribose-5-^{3}H] -cGMP o,5 pmol entsprechen 5 nmol/l im Ansatz
5o µl Proteinfraktion

Fraktion		Vol.	Protein mg	gebundenes cGMP pmol/mg Protein	gebundenes cAMP pmol/mg Protein	Verhältnis cGMP : cAMP
Homogenat-Überst.	L1D	1848	16813	o,o684	--	--
Essigsäurefällung Niederschlag	L2D	198o	13577	o	--	--
$(NH_4)_2SO_4$ Fällung (Überstand)	L3D	435o	4468	o	--	--
Niederschlag	LPD	16o	87o2	o,1775	--	--
Säulenfraktionen	P1a	45	262	o,o655	--	--
	P1b	35	191	o.6988	o.o475	1 :15
	P1c	8o	1669	o,5245	o,o451	1 : 12
	P1d	4o	16	o,3763	o,14o1	1 : 3
	P2	285	9o1	o,o545	1,251	23 : 1
	P3	336	511	o	o,o513	--
	P4	61o	526	o	o,2168	--
	P5	239	4o	o	o	--

Tab. 2 Isolierung, Anreicherung und Charakterisierung von cGMP-bindendem Protein aus Hummermuskel

3.3. Erstellung der Bindungen für einen simultanen Bindungsassay für cAMP und cGMP

3.3.1. Ermittlung der optimalen Pufferzusammensetzung

Die im endgültigen Versuchsansatz verwendete Pufferzusammensetzung wurde durch successive Adaptierung der Pufferbedingungen von BROWN (für cAMP-Bindung) an die von DINNENDAHL (für cGMP) erarbeitet. Tab. 3 gibt 4 verschiedene Ansätze A - D wider.
Die prozentuale Bindung für cAMP gegenüber dem Ausgangspuffer A war in D etwas angestiegen, ohne daß die errechnete Dissoziationskonstante K_D signifikant verändert wurde. Die Ansätze B und C führten zu einem Abfall der relativen cAMP-Bindung.

3.3.2. Erstellung der optimalen Bindungsverhältnisse im Doppeltest

Die in Abb. 3 und 4 aufgezeigten Sättigungskurven für $[^3H]$-cAMP, $[^{14}C]$-cAMP bzw. $[^3H]$-cGMP mit den jeweilig spezifischen Bindungsproteinen wurden mit Puffer D (in Tab. 3) ermittelt. Die Skelettmuskelprotein-Konzentration betrug jeweils o,16 g/l, die der Hummermuskelfraktion 4,4 g/l.
Es wurden Nucleotidmengen zwischen

1 und 1oo nmol/l $[^3H]$ cAMP bzw $[^{14}C]$ cAMP sowie
1 und 8o nmol/l $[^3H]$ cGMP verwendet.

Die Ergebnisse sind unmittelbar und nach LINEWEAVER-BURK doppelt reziprok aufgetragen. Die Dissoziationskonstanten K_D wurden nach folgender Formel berechnet:

$$K_D = \frac{\text{cyclisches Nukleotid} \times \text{Bindungsprotein}}{\text{cyclisches Nucleotid - Proteinkomplex}}$$

Tab. 3 Einfluß unterschiedlicher Pufferbedingungen auf die Bindung von $[^3H]$ cAMP auf die angenommene Dissoziationskonstante beim Einzelbindungstest für cAMP

	Pufferbedingungen THAM-HCl-Puffer pH 7,4 nmol/l	Theophyllin mmol/l	SQ 2o.oo9 g/l	2-Mercapto-aethanol mmol/l	$MgSO_4$ mmol/l	% $[^3H]$ cAMP Bindung (n=5)	angenommene Dissoziationskonstante nmol/l (n=2-4)
A	55	4	--	3	--	3o±4	2.9±o.8
B	12o	5.3	--	4	--	24±6	3.o±o.9
C	12o	--	o.3	--	--	26±5	3.3±o.7
D(P7)	12o	--	o.3	4	26.7	36±5	2.6±o.6

Gesamtvolumen o.15 ml, $[^3H(G)]$ cAMP (38,4 Ci/mmol):o,25 pmol; Bindungsprotein aus Skelettmuskel vom Kalb : 2.65 µg

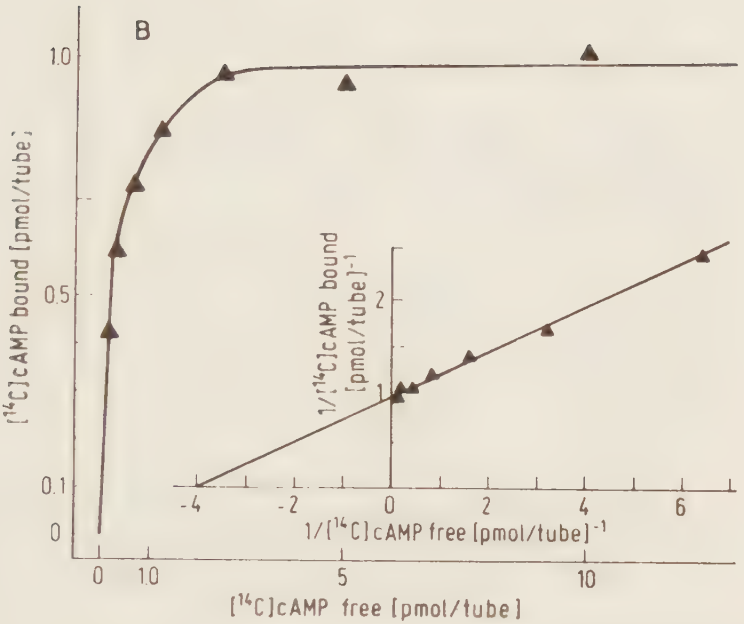


Abb. 3. [^{14}C]cAMP-Sättigungskurve und Doppelreziprokauftragung nach LINEWEAVER-BURK. Ansteigende Mengen von [adenine-U-^{14}C]cAMP (1o.6 TBq/mol; 287 mCi/mmol) wurden für 2 Stunden bei 4°C zusammen mit 1.6 µg Proteinfraktion D VI aus Rinderskelettmuskel inkubiert mit den Pufferbedingungen D aus Tab. 3. Gesamtvolumen o.1 ml.

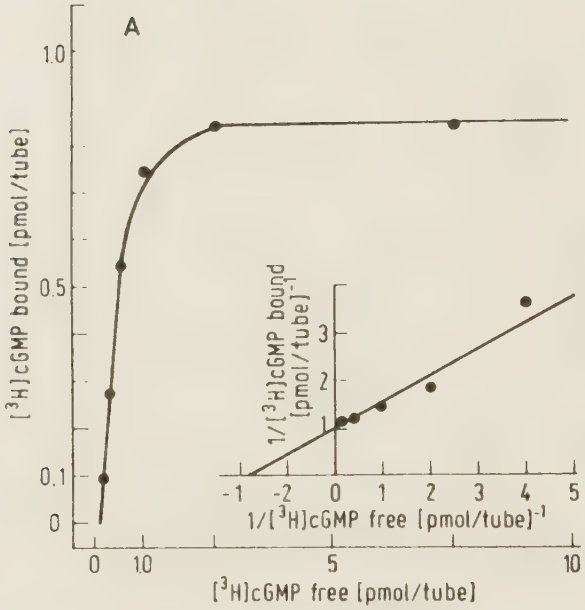


Abb. 4. [^{3}H]cGMP-Sättigungskurve und Doppelreziprokauftragung analog Abb. 3. Es wurden ansteigende Mengen von [8-^{3}H]cGMP (777 TBq/mol; 21 Ci/mmol) für 2 Stunden bei 4 ^{o}C zusammen mit 44o µg Proteinfraktion P1b aus Hummermuskel inkubiert. Die übrigen Bedingungen entsprechen denen aus Abb. 3.

K_D war für $[^3H]$-cAMP bzw. für $[^{14}]$-cAMP gleich $2{,}2 \times 10^{-9}$ mol/l und stimmt mit den Angaben von TOVEY (83), AKNES (1), GILMAN (23) und TSANG (78) überein.
Die Dissoziationskonstante für $[^3H]$-cGMP liegt bei 7×10^{-9} mol/l und entspricht damit dem von MURAD (56) gefundenen Wert. Für den endgültigen Test wurden Proteinmengen verwendet, die im Sättigungsbereich des jeweiligen cyclischen Nucleotids lagen.
Für cAMP betrug das Verhältnis Radionucleotid : Protein 4000 pmol/mg Protein, für cGMP 2,5 pmol/mg. Auf diese Weise konnte für die doppelt-logarithmische Auftragung Linearität der Standardkurve erreicht werden, ohne daß aufwendige Berechnungen notwendig waren. (Abb. 5),

Die Zugabe der relativ großen Menge von cGMP-Bindungsprotein zum cAMP Test führte im Doppelbindungstest zu einer 10 bis 20-fachen Steigerung der Dissoziationskonstanten verschiedener Chargen des Proteins. Dieser Effekt erscheint unspezifisch, da sowohl die Zugabe von einem als Inhibitor der Proteinkinase beschriebenen Gewebefaktor, einem hitzestabilen Protein (58), als auch von Rinderserumalbumin (1,83) einen Anstieg der Bindungskapazität für zyklische Nukleotide hervorruft.

Die K_D von cGMP wurde durch Zugabe von cAMP-Bindungsprotein nicht verändert. Erst mehr als 40 pmol cAMP führten zu einem signifikanten Abfall der Bindung von $[^3H]$-cGMP(Abb.6).
Doppelt logarithmische Auftragung der Standardkurven ergab einen linearen Verlauf für beide Nucleotide mit äußerst geringen Parallelverschiebungen gegenüber den Einzelbestimmungen. Im Doppeltest lag die Linearität (log - log) für cAMP zwischen 200 und 1600 nmol/l und für cGMP zwischen 5 und 160 nmol/l. (Abb. 5).
Die experimentellen Bindungsdaten verhalten sich wie kompetitive Hemmstoffe von Enzymreaktionen unter den jeweiligen Ausgangsbedingungen.

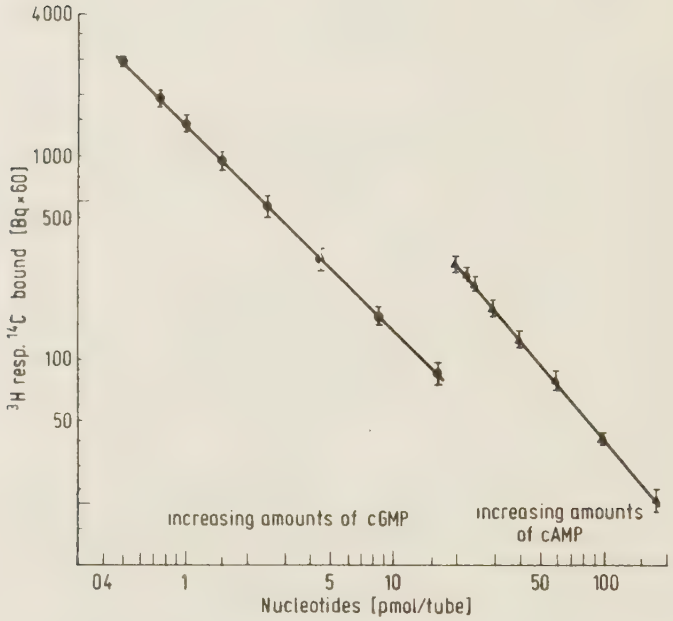


Abb. 5. Dosis-Bindungskurven für den Simultanbindungs-Assay für cAMP und cGMP im log-log-Maßstab. Mittelwerte mit graphischen (log-log) Standardabweichungen aus 5 Experimenten. Die Versuchsbedingungen gehen aus 2.3.4. bzw. aus 3.3.3. hervor.

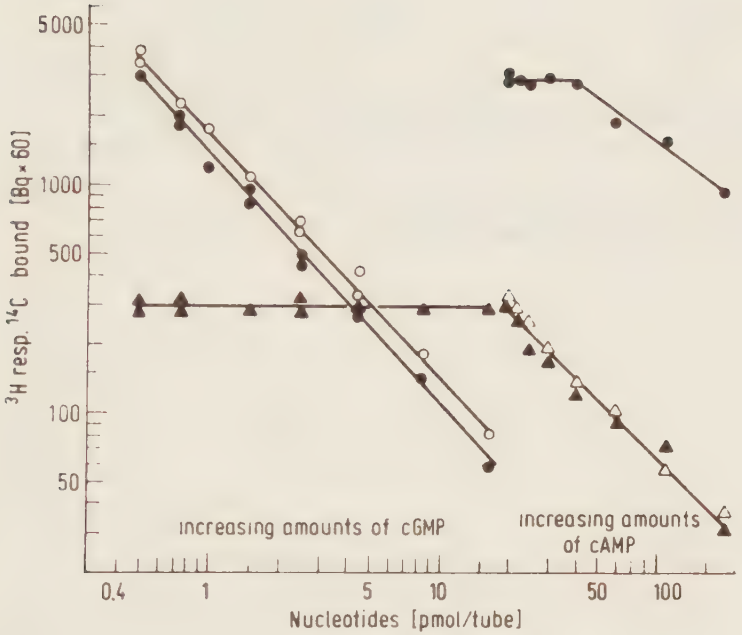


Abb.6. Dosis-Bindungskurven für cAMP und cGMP an Rinderskelettmuskelproteinfraktion (A) und Hummermuskelproteinfraktion (G).

a) o——o 5 µg Protein A, 2oo µg Protein G, o,5 pmol [ribose-5-^{3}H]cGMP (1.15 PBq/mol; 31 Ci/mmol) plus ansteigende Mengen von cGMP, wie auf der cGMP Skala angegeben.

b) ●——● gleiche Bestandteile wie unter a) plus 2o pmol [adenine-U-^{14}C]cAMP (1o.6 PBq/mol; 287 mCi/mmol); nur ansteigende Mengen von cGMP wurden hinzugegeben, wie für die [^{3}H] cGMP-Skala beschrieben. Zusätzliche Darstellung auf der [^{14}C] cAMP Skala.

c) Δ——Δ 5 µg Protein A, 2oo µg Protein G, 2o pmol [adenine-U-^{14}C]cAMP plus ansteigende Mengen von cAMP wie auf der cAMP Skala angegeben.

b.w.

zu Abb. 6

d) ▲—▲ gleiche Bestandteile wie unter c) plus o,5 pmol [ribose-5-^{3}H]cGMP; nur Zugabe ansteigender Mengen von cAMP wie für die [^{14}C]cAMP Skala angegeben, mit zusätzlicher Darstellung auf der [^{3}H]cGMP-Skala.

Gesamtvolumen o.1 ml, Pufferbedingungen wie unter D, Tab 3. Weitere Details sind im Text beschrieben.

3.3.3. Ansatz für den simultanen Bindungsassay für cAMP und cGMP

Gesamtvolumen : 1oo µl

Probevolumen : 2o µl (Urin 1o bis 2o mal verdünnt mit Puffer D) (P7 2.2.4.)

Radioaktiver Tracer : 1o µl o,5 pmol [Ribose-5-^{3}H] cGMP(31Ci/mmol) + 2o pmol [adenine-U-^{14}C] cAMP (287 mCi/mmol)

in Puffer D

Nach mischen, starten mit 5 µg cAMP-Bindungsprotein (s. Tab 1)

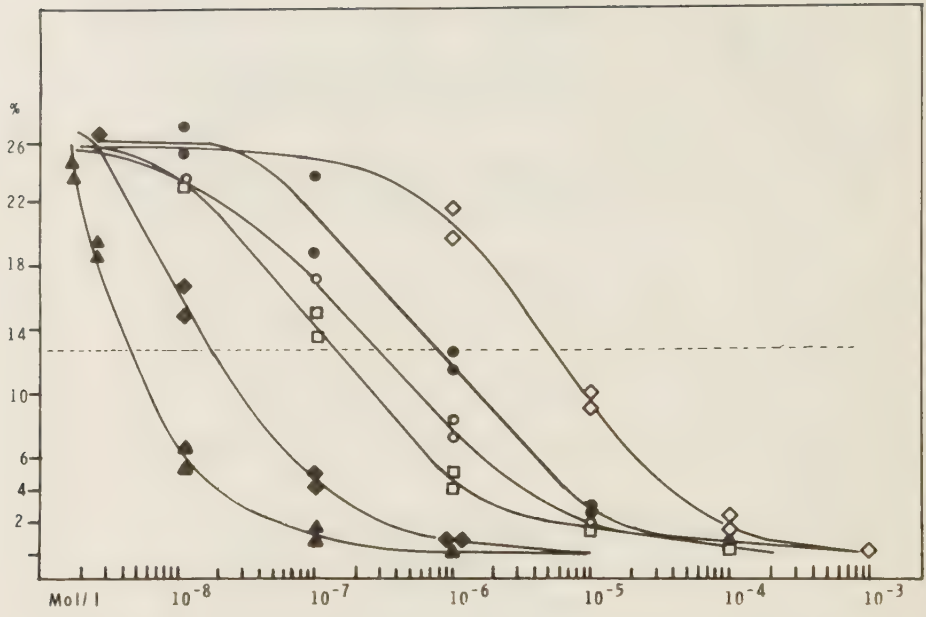
plus 2oo µg cGMP-Bindungsprotein (s.Tab. 2) in Puffer D

Inkubation 3 h bei 4°C und Aufbereitung wie unter 2.3.4. beschrieben.

3.3.4. Interferenz von verwandten Substraten im cAMP und cGMP-Bindungstest

Um den Einfluß verschiedener, die Bindung von cAMP und cGMP störender Nucleotide und Nucleoside bzw. deren Basen auszuschließen, wurde in Anlehnung an frühere Untersuchungen (13,23,43,52,56,78,83,86), die 5o%-Hemmung der [^{3}H] cAMP-Bindung und der [^{3}H] - cGMP-Bindung an ihre Rezeptoren bestimmt. (Tab. 4.5). Weiterhin wurde die Hemmung der [^{3}H] cAMP-Bindung in Prozent bei 1 mmol/l (Tab. 6) bzw. diejenige von [^{3}H] cGMP-Bindung bei o.1 und 1.o µmol/l gemessen. (Tab. 7)

Hemmung der [^{3}H] cAMP-Bindung von mehr als 5o % trat von den in vivo vorkommenden Nucleotiden für ADP in der unphysiologisch hohen Konzentration von ca. 1 mmol/l auf. Bei niedrigeren Konzentrationen und damit stärker interferierten cGMP,cCMP,cXMP,cUMP und cIMP (vgl. auch Abb.7), was bereits von GILMAN (23) und BROWN (13) beschrieben worden ist.



Abb,7. Interferenz cyclischer Nukleotide mit cAMP. Darstellung der Bindung in % vom 1oo %-Wert (s.2.3.4.) auf der Ordinate. Die strichlierte Linie entspricht der 5o %-Hemmung. Konzentrationen im log-Maßstab in mol/l auf der Abskizze. Genaue Werte und Ansatzbedingungen s. Tab. 4. ▲ = cAMP, ◆ = cIMP, ◘ = cGMP, o =cCMP, ● =cUMP ◇ = cXMP

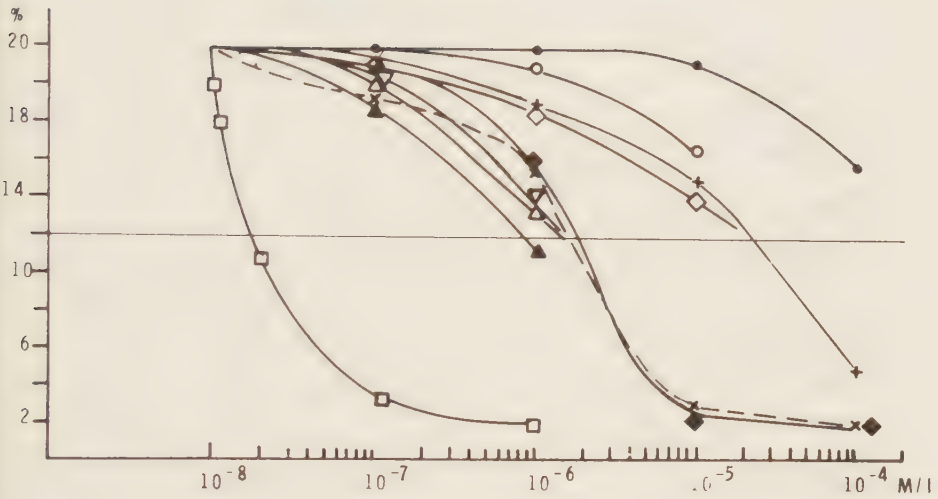


Abb. 8. Interferenz cyclischer Nukleotide mit cGMP. Darstellung der Bindung in % vom 1oo %-Wert (vgl. 2.3.4.) auf der Ordinate. Die durchgezogene Linie entspricht der 5o %-Hemmung. Konzentration im log-Maßstab in mol/l auf der Abszisse. Genaue Werte und Ansatzbedingungen s. Tab. 5 □ = cGMP
× = cAMP, o = cCMP, ◆ = cIMP, ◇ = cXMP,
+ = moBucIMP, ▲ = 8-Br-cIMP, △ = diBucGMP,
● = moBucUMP, ▽ = diBucAMP

Tab 4: 5o%-Hemmung der [8 - ^{3}H] cAMP-Bindung durch Analogsubstanzen im Bindungstest mit Rinderskelettmuskelprotein.

Substanz	mmol/l
8-Br-cAMP	6 x $1o^{-9}$
8-Br-cIMP	1.o x $1o^{-9}$
moBucAMP	1.6 x $1o^{-8}$
cIMP	1.7 x $1o^{-8}$
diBucAMP	2.8 x $1o^{-8}$
cCMP	1.4 x $1o^{-7}$
8-Br-cGMP	1.6 x $1o^{-7}$
cGMP	2.5 x $1o^{-7}$
cUMP	7.3 x $1o^{-7}$
moBucIMP	7.8 x $1o^{-7}$
cdAMP	2.4 x $1o^{-6}$
cXMP	5.8 x $1o^{-6}$
cdTMP	7.o x $1o^{-6}$
moBucUMP	9.6 x $1o^{-6}$
diBucGMP	2.2 x $1o^{-5}$
ADP	3.o x $1o^{-4}$
cG-2',3'-MP	8.o x $1o^{-4}$

Ansatzbedingungen (Gesamtvolumen 15o µl)
1,8 µg Proteinfraktion
1,67 nmol/l [^{3}H] cAMP
12o mmol/l THAM-HCl pH 7.4
3o mmol/l $MgSO_4$
3o mg/l SQ 2o.oo9
Inkubationszeit: 9o min bei 4°C

Tab. 5: 5o%-Hemmung der $[^3H]$ -cGMP Bindung durch Analogsubstanzen im Bindungstest mit Hummermuskelprotein.

Substanz	mol/l
8-Br-cGMP	$5.5 \times 1o^{-9}$
8-Br-cIMP	$6.5 \times 1o^{-7}$
diBucAMP	$9.5 \times 1o^{-7}$
diBucGMP	$1.o \times 1o^{-6}$
8-Br-cAMP	$1o \times 1o^{-6}$
cIMP	$1.7x\ 1o^{-6}$
cAMP	$1.8 \times 1o^{-6}$

Ansatzbedingungen (Gesamtvolumen 1oo µl)
25o µg Proteinfraktion
1o nmol/l $[8-^3H]$ cGMP
12o mmol/l THAM-HCl pH 7.4
3o mmol/l $MgSO_4$
3o mg/l SQ 2o.oo9
Inkubationszeit 18o min bei 4^oC

Tab. 6: Analogsubstanzen, die [^{3}H] cAMP in einer Konzentration von 1 mmol/l verdrängen. Angaben in %. Übrige Versuchsbedingungen wie in Tab. 4.

ADP	7 %	Adenosin	27 %
GDP	38 %	GTP	26 %
ATP	34 %	5-Br-UTP	21 %
Adenin	33 %	ITP	2o %
cC-2',3'-MP	3o %	cG-2',3'-MP	2o %
UTP	28 %	cA-2',3'-MP	17 %
5'-GMP	28 %	5'-AMP	3 %
Guanosin	27 %		

Tab.7: Hemmung in % der $[^3H]$ -cGMP Bindung durch Analogsubstanzen in Konzentrationen von $1o^{-7}$ mol/l und $1o^{-6}$mol/l

Substanz	$1o^{-7}$ mol/l	$1o^{-6}$mol/l
8-Br-cGMP	98	1oo
8-Br-cIMP	27	58
moBucAMP	25	5o
diBucGMP	19	49
8-Br-cAMP	19	-
cAMP	19	35
diBucAMP	15	5o
moBucIMP	13	16
cXMP	13	22
cIMP	12	36
cdAMP	1o	1o
moBucUMP	6	6
cd TMP	6	3
cCMP	5	7
ADP	o	o
GDP	o	o
A-5'-MP	o	o
G-5'-MP	o	o

Die Ansatzbedingungen entsprechen denen von Tab. 5

Die Ergebnisse dieser Autoren stimmen nach Umrechnung auf die hier angewendeten Versuchsbedingungen mit den Werten von Tab. 4 gut überein. Von den substituierten Nukleotiden ergab sich für 8-Br-cAMP (6.o x $1o^{-9}$mmol/l) eine auffallend hohe Bindungsaffinität, was unter Umständen Auskunft über die Rezeptorkonfiguration geben kann. Aus den Ergebnissen der [^{3}H] cAMP-Bindungshemmung der Tab. 4 und 6 kann gefolgert werden, daß die Konzentrationen physiologisch vorkommender Nukleotide, Nukleoside bzw. deren Basen 1o bis 1ooo mal höher liegen , als im Test zu erwarten ist. Substituierte cyclische Nukleotide dürften gagegen z.T. stark interferieren.
Bei den 5o%-Hemmungen (Tab.5) bot 8-Br-cGMP eine höhere Rezeptoraffinität als cGMP. cAMP zeigte erst in 1oo-fach höherer Konzentration eine Verdrängung. Die prozentuale Hemmung weiterer Substanzen bei $1o^{-7}$ bzw. bei $1o^{-6}$ mmol/l ist aus Tab. 7 ersichtlich.

Von den in vivo vorkommenden Nukleotiden erreicht keines bei $1o^{-6}$ mmol/l die 5o%-Marke. Die gefundenen Ergebnisse korrelieren unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Ansatzbedingungen gut mit Werten von MURAD (57) und DINNENDAHL (13). Die hohe Spezifität des cGMP-Rezeptors geht aus Abb.8 im graphischen Vergleich hervor. Alle besprochenen Werte wurden aus Doppel-bis Vierfachbestimmungen ermittelt, z.T. nach Wiederholung von Tag zu Tag.

3.4. Simultane Messung von cAMP und cGMP im menschlichen Urin

3.4.1. Uringewinnung und Probenvorbereitung

Urin wurde in Flaschen mit 2,5 g Theophyllinpulver als Phosphodiesterasehemmer gesammelt. Am Folgetag der 24-Stundensammelperioden wurde das Volumen bestimmt, der Urin auf 4°C vorgekühlt und im Verhältnis 1:5 bis 1:2o mit P7 (2.2.4.) verdünnt.
Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt, außerdem Wiederauffindungskontrollen. Schließlich wurden Richtigkeitskontrollen (getrennte Einwaagen) für die Standards im selben Test erhoben.

3.4.2. Genauigkeit des Doppelbindungstests für Urinproben

Für die Richtigkeitskontrolle von Urinbestimmungen wurden im Doppelbindungstest zu den Urinproben jeweils 2 pmol cGMP bzw. 2o pmol cAMP hinzugegeben. In Dreifachbestimmungen fanden sich für cGMP Werte zwischen 92% und 1o8% und für cAMP Daten zwischen 89% und 111 % (vgl. Tab. 8).
Verglichen mit zwei Urinanalysen, die mittels Einfachbindungstests erstellt wurden für cGMP nach (56) : 1ooo bzw. 33o nmol/l und für cAMP nach (13): 6.7 bzw. 2.9 nmol/l, liegen die Ergebnisse des Doppelbindungstests mit 1o5o bzw. 34o nmol/l für cGMP und mit 6.3 bzw. 2.8 µmol/l für cAMP übereinstimmend unter der für klinische Routineverfahren geforderten 1o% Fehlergrenze (2o).
Weiterhin korrespondieren die Ergebnisse von 2 Urinbestimmungen die im Einfachbindungstest mit beiden Bindungsproteinen durchgeführt wurden gut (Fehler ◄ 1o %) mit denen im Doppelbindungstest :

cAMP (µmmol/l)		cGMP (nmol/l)	
Einfachtest	Doppeltest	Einfachtest	Doppeltest
6.26	6.88	585	594
8.51	8.23	948	888

Es wurden wie oben Bestimmungen durchgeführt und der gesamte Versuch in einem Ansatz abgewickelt.

3.4.3. Präzision

Der Variationskoeffizient von Tag zu Tag lag in 1o verschiedenen Experimenten für cGMP zwischen 8 und 1o % und für cAMP zwischen 5 und 12 %, wenn beide Nucleotide simultan in einem molaren Verhältnis zwischen 1 zu 2,5 und 1 zu 4o lagen. Ähnliche Koeffizienten wurden bei den oben beschriebenen Wiederauffindungsversuchen in einem molaren Verhältnis von 1:2o gefunden. (Tab. 8). Innerhalb der Serie lag die Präzision etwas niedriger : 5 - 8 % bzw. 5 - 9 %. In Tab. 9 sind die genauen Daten aufgetragen.

3.4.4. Spezifität

Obwohl cAMP im Doppelbindungstest von beiden Rezeptorproteinen gebunden wird, verlaufen die log-log Auftragungen der Dosis-Bindungskurven linear (Abb. 5). Sie werden nicht beeinflußt durch ansteigende cGMP Konzentrationen zwischen 5 und 16o nmol/l (Abb. 5 und 6). Erst 1o-fach höhere cGMP Konzentrationenverdrängen cAMP vom Rinder-Skelettmuskelprotein. cGMP wird ausschließlich vom Hummermuskelprotein gebunden; cAMP-Konzentrationen von mehr als 4oo nmol/l beginnen dieses vom Rezeptor zu verdrängen. Dabei wird eine 5o bis 1oo-fach höhere Dissoziationskonstante gemessen. Aus diesen Gründen müssen Urinproben 1o bis 2o-fach mit Puffer D (P7, Tab.3) verdünnt werden.

Tab. 8: Beispiel für Varianz und Wiederauffindung bei Simultanbestimmung von cAMP und cGMP im menschlichen Urin mit dem Doppelbindungstest (Ansatz 1.3.3.).

Proband	cAMP (nmol/l)	Wiederauffindung von 12.8 pmol cAMP	cGMP (nmol/l)	Wiederauffindung von 1.28 pmol cGMP
A	-	16.5	575	1.o9
	5875	1o.5	638	1.46
	5875	-	65o	1.39
	$\bar{x}$ 5875 ± 0		$\bar{x}$ 62o ± 4o	
B	445o	-	625	1.29
	4125	8.2	675	1.29
	55oo	12.2	575	1.62
	$\bar{x}$ 469o ± 719		$\bar{x}$ 625 ± 5o	
C	3875	-	145o	1.13
	325o	9.5	145o	1.15
	3ooo	1o.o	925	-
	$\bar{x}$ 3375 ± 451		$\bar{x}$ 1275 ± 3o3	
D	35oo	14.3	588	1.32
	3375	11.8	725	1.46
	45oo	9.8	5oo	1.42
	$\bar{x}$ 379o ± 617		$\bar{x}$ 6o4 ± 113	
	Varianz 11%	$\bar{x}$ = 11.4 ± 2.6 pmol	Varianz 14%	X = 1.31 ± 16 pmol
		Wiederauffindung 1o2 ± 1o %		89 ± 2o %

Tab 9 : Präzision des Doppelbindungstests für cGMP und cAMP

Cyclonucleotide nmol/l	Präzision von Tag zu Tag $\bar{x}$(Mittelwert) nmol/l	Variations-koeffizient	Präzision in der Serie Variationskoeffizient
1o cGMP	1o.3	8.5%	8.o%
4o cGMP	41.3	9.3%	5.4%
1oo cAMP	99.5	5.66%	5.2%
4oo cAMP	416.3	12.1%	9.5%

Die **Probenansätze enthielten**
1o pmol cGMP plus 4oo pmol cAMP und 4o pmol cGMP plus 1oo pmol cAMP. Es wurden Dreifachwerte von 1o verschiedenen Experimenten gemessen. Ansatzbedingungen s 3.3.3.

Andererseits müssen die im cGMP-Wert bei hohen cAmp-Konzentrationen (im log-log-Maßstab linear) wie folgt korrigiert werden (Werte aus Abb.6):

500 nmol/l cAMP imitiert 1.0 nmol/l cGMP

800 nmol/l cAMP imitiert 2.6 nmol/l cGMP

1600 nmol/l cAMP imitiert 6.8 nmol/l cGMP

Trotz dieser (relativen) Einschränkung der Methode sind die cGMP-Konzentrationen in den verdünnten Urinproben hoch genug, um exakte Messungen zu erlauben.

3.4.5. Vergleich der cAMP- und cGMP-Konzentrationen im menschlichen Urin

3.4.5.1. 24h-Ausscheidung von cAMP und cGMP

Wie aus Tab.10 zu ersehen ist, stimmen die im Doppelbindungstest gemessenen Konzentrationen von cAMP und cGMP (auch bezogen auf 1g Creatinin) gut überein mit solchen Werten, die im Einfachtest von anderen Autoren ermittelt worden sind. Das durchschnittliche Verhältnis cAMP : cGMP betrug 7.6 : 1 (n = 24).

Anleitung zum Sammeln von 36-Stunden-Urin von gesunden Personen

Nr.: Dat. :

Vorname, Name : Alter:

Gelieferte Sammelgefäße bitte vor Gebrauch n i c h t ausspülen oder umkippen, das weiße Pulver in den Flaschen (Theophyllin) dient der Stabilisierung des Urins. Beginn um 17.45 Uhr - 18.oo Uhr mit Entleerung der Blase. Diesen Urin nicht sammeln. Ab 18.oo Uhr bis spätestens 24.oo Uhr Urin sammeln in Flasche 1. - Wichtig ist das Sammeln des gesamten Urins. - Ab 24.oo Uhr bis 6.oo Uhr (um 6.oo Uhr Urin lassen !) sammeln in Flasche2. Ab 6.oo Uhr bis spätestens 12.oo Uhr Urin lassen und sammeln in Flasche 3. Diese 3 Flaschen jetzt abgeben. Danach von 12.oo Uhr bis 24.oo Uhr Urin sammeln in Flasche 4, ab 18.oo Uhr bis 24.oo Uhr Urin sammeln in Flasche 5, ab 24.oo Uhr bis 6.oo Uhr (s.oben) Urin sammeln in Flasche 6. Bei Abgabe dieser Flaschen Blutentnahme zur Überprüfung der Nierenfunktion.

Anmerkung:Während der Sammelperioden sollen keine ungewöhnlichen körperlichen (kein Sport, keine schwere Arbeit, kein ärztlicher Eingriff) und keine schweren geistigen (keine Prüfungen, Konferenzen usw.) Belastungen vorgenommen werden und keine seelischen Beeinträchtigungen auftreten. Es soll ferner nicht geraucht werden, kein Alkohol und kein Kaffee bzw. schwarzer Tee genossen werden. Insgesamt soll ein möglichst durchschnittlicher (Arbeits-) Tag eingehalten werden.

3.4.5.2. Circadiane Ausscheidung von cAMP und cGMP

Die circadiane Ausscheidung beider cyclischer Nucleotide zeigt große individuelle Unterschiede (Abb.9), im allgemeinen liegen die cGMP - Konzentrationen um einen Faktor von 3 bis 15 niedriger als die cAMP-Konzentrationen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen andere Autoren (42,57,77)

Auf S. 48 ist ein Sammelanleitungsschema, wie es in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, abgebildet. Darin wurden etwaige Beeinflußungen in der Ausscheidung der cyclischen Nukleotide in der Anmerkung berücksichtigt (42,57,77).
Das Verhältnis cAMP : cGMP lag hier zwischen 15.3 : 1 und 2.5 : 1 (n = 16). Bei 5 Personen lag das Verhältnis bei Tageslicht am höchsten und nachts am niedrigsten. Bei 2 Nachtarbeitern war es nachts am höchsten und bei Tage niedriger(39). Diese Ergebnisse dienen als Anwendungsbeispiele; Untersuchungen größerer Kollektive sind hier notwendig.

Tab.1o.: Vergleich der cAMP-undcGMP-Konzentrationen im Urin gesunder Erwachsener gemessen mit dem Proteinbindungstest

1. cAMP a) µmol/24h Einfachbindungstests

4.o - 6.8	MURAD (55)	4.3	HAMET(3o)
4.3 - 4.8	STONE (77)	3.4	RAJI (64)
5.o	COFFEE (16)	6.5-6.8	LATNER (48)
4.9	KUCHEL(42)	2.o-7.o	BROADUS(11)
3.6	BROWN (14)	4.2	MADSEN (52)
5.6	PAUL (6o)	3.5-6.2	AUGUST (3)
3.5	TAYLOR(81)		

Doppeltest (3.3.3.):
4.4 - 6.7

b) µmol/g Creatinin (Creatininbestimmung mit Technikon Autoanalyser) Ergebnistests

5.9	AKSNES (1)	5.o	SHAW (7o)
4.4	BROADUS (11)	2.9	TSANG(78)
4.5	GELOT (22)	3.2	MADSEN(52)
2.2	SCHWARTZ (75)	2.2-4.4	AUGUST (3)

Doppeltest (3.3.3.):
3.6 - 6.o

2. cGMP a) µmol/24h

o.72	BROADUS (11)	Einzelbindungstest
o.47-o.83		Doppeltest (3.3.3.)

b) µmol/g Creatinin

o.47 - o.63	MURAD (55)	Doppeltest
o.23 - o.68		Doppeltest (3.3.3.)

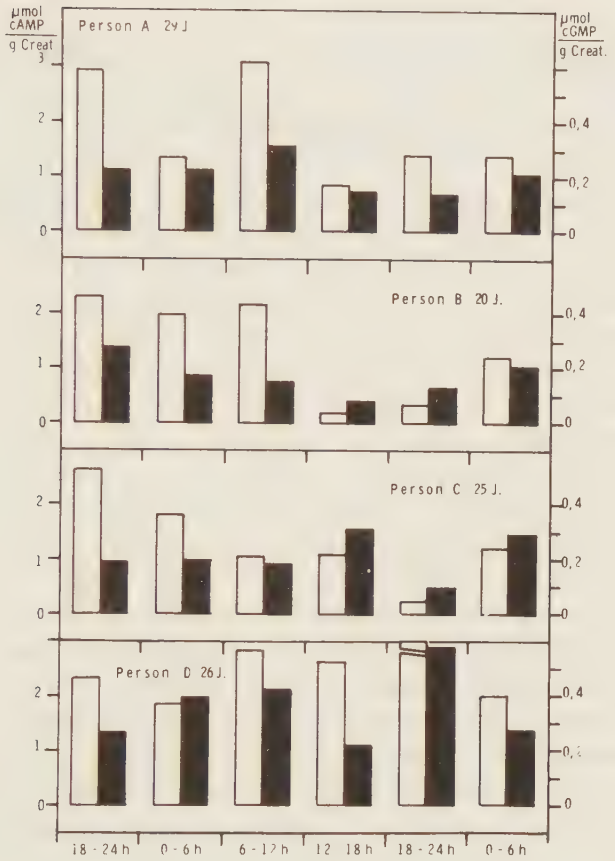


Abb.9. Circadian-Ausscheidung von cAMP und cGMP bei 4 gesunden jungen Probanden nach dem beschriebenen Anleitungsschema. Zu beachten ist, der unterschiedliche Maßstab der Konzentrationen pro Gramm Creatinin von 5 : 1 auf der Ordinate zur besseren graphischen Darstellung. Auf der Abszisse sind die 6-Stunden-Sammelperioden eingetragen.

4. ZUSAMMENFASSUNG

1) Aus Rinderskelettmuskulatur bzw. aus Hummermuskel werden Proteinfraktionen isoliert, die fast ausschließlich cAMP bzw. cGMP binden. Gegenüber den Rohextrakten wurde eine 19-fache bzw. 1o-fache Anreicherung erzielt. Die Kreuzreaktivität der verwendeten Fraktionen betrug bei cAMP-Protein 1:194 gegenüber cGMP, und für cGMP-Protein 1:12 bis 1:15 gegenüber cAMP.

2) Mittels dieser beiden Proteinfraktionen wird ein simultaner Bindungsassay für cAMP und cGMP im menschlischen Urin entwickelt, in dem die bereits beschriebenen Testbedingungen für cAMP (13) modifiziert und an die für cGMP beschriebenen (18) angeglichen werden. Optimale Bindungsverhältnisse werden erstellt und die Interferenz mit anderen cyclischen Nukleotiden (bzw. deren Derivaten) Nukleotiden, Nukleosiden und Basen untersucht. Die störenden Konzentrationen dieser natürlich vorkommenden Verbindungen liegen im Urin 1o bis 1ooo mal höher als im Doppeltest erwartet, substituierte cyclische Nukleotide dürften dagegen bereits in cAMP-und cGMP-vergleichbaren Urin-Konzentrationen interferieren.

3) Wiederauffindung,Genauigkeit und Präzision liegen für den neuen Doppelbindungstest für Urinproben im 1o%-Bereich. Mit 1obis2o-fach verdünnten Urinproben werden eine gute Spezifität und keine Interferenz beobachtet. Der Test wurde auf die im menschlichen Urin vorkommenden cAMP und cGMP Konzentrationen angeglichen. Dadurch und durch die Einführung von Elektronischer Datenverarbeitung wird eine verbesserte Auswertung der Ergebnisse erzielt, insbesondere durch Wegfall von Ablesefehlern.

4) Die 24h-Konzentrationen für cAMP liegen bei 4.4-6.7 µmol (3.6-6.o µmol/g Creatinin) für cGMP bei o.47-o.83 µmol (o.23-o.82 µmol/g Creatinin).

Diese Werte stimmen mit den Literaturwerten gut überein.

Bei der circadianen Ausscheidung werden große individuelle Unterschiede gefunden mit einem Überwiegen der cAMP-Konzentration.

5) Mit dem neuen Doppelbindungstest lassen sich bis zu 5o Proben pro Tag mit Dreifach-Werten analysieren.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1) AKSNES, L., SÖVIK, O.: A Protein-Binding Assay for Direct Determination of Adenosine 3', 5'-Monophosphate in Amniotic Fluid, Cerebrospinal Fluid, Plasma and Urine. Scand. J. clin. Lab. Invest., 36, 289 - 298 (1976)

2) ALBANO, J.D.N., BARNES, D.G., MAUDSLEY, D.V., BROWN, B.L., EKINS, R.P.: Factors Affecting the Saturation Assay of Cyclic AMP in Biological Systems. Analytical Biochemistry 60, 130 - 141 (1974)

3) AUGUST, G.P., HUNG, W.: The Urinary Excretion of Adenosine 3', 5'-Monophosphate in Children and Adolescents. J. Clin. Endocrinol. Metab. 37, 476 - 479 (1973)

4) AURBACH, G.D., MARCUS, R., WINICKOFF, R.N.: Urinary excretion of 3', 5'-AMP in syndromes considered refractory to parathyroid Hormone. Metabolism 19/10, 799 - 808 USA (1970)

5) BEAVO, J.A., HARDMAN, J.G., SUTHERLAND, E.W.: Stimulation of c-AMP hydrolysis by c-GMP. J. Biol. Chem. 246, 3841 - 3846 s.l. (1971)

6) BEER, B., CHASIN, M., CLODY, D.E., VOGEL, J.R., HOROVITZ, Z.P.: Cyclic Adenosine Monophosphate Phosphodiesterase in Brain: Effect on Anxiety. Science, 176, 428 - 430 (1972)

7) BERNSTEIN, R.A., LINARELLI, L., FACKTOR, M.A.: Decreased urinary c-AMP 3', 5' in asthmatics. J. Lab. Clin. Med. 80/6, 772 - 779 USA (1972)

8) BLONDE, L., WEHMANN, R.E., STEINER, A.L.: Plasma Clearance Rates and Renal Clearance of ^{3}H-labeled Cyclic AMP and ^{3}H-labeled Cyclic GMP in the Dog. J. Clin. Invest., 53, 163 - 172 (1974)

9) BONSNES, R.W., TAUSSKY, H.H.: On the colorimetric determination of creatinine by the Jaffe reaction. J. Biol. Chem. 158, 581 - 591 (1945)

10) BROADUS, A.E., HARDMAN, J.G., KAMINSKY, N.J., BALL, J.H., SUTHERLAND, E.W., LIDDLE, G.W.: Extracellular cyclic nucleotides. Ann. N.Y. Acad. Sci. 185, 50 - 66 s.l. (1971)

11) BROADUS, A.E., KAMINSKY, N.J., NORTHCUTT, R.C., HARDMAN, E.W., SUTHERLAND, E.W., LIDDLE, G.W.: Effects of glucagon on adenosine 3', 5' monophosphate and cGMP in human plasma and urine. J. Clin. Invest. 49, 2237 - 2245 (1970)

12) BROOKER, G., THOMAS, L.J., APPLEMANN, M.M.: The assay of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate and guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate in biological materials by enzymatic radioisotopic displacement. Biochemistry 7, 4177 - 4181 (1968)

13) BROWN, B.L., ALBANO, J.D.M., EKINS, R.P., SGHERZI, A.M.: A Simple and Sensitive Saturation Assay Method for the Measurement of Adenosine 3', 5'-Cyclic Monophosphate. Biochem. J. 121, 561 - 562 (1971)

14) BROWN, B.L., SALWAY, J.G., ALBANO, J.D.M., HULLIN, R.P., EKINS, R.P.: Urinary excretion of cyclic AMP and manic depressive psychosis. Brit. J. Psychatr. 120, 405 - 408 (1972)

15) CHEN, R.F.: Removel of fatty acids from Serum Albumin by Charcoal Treatment. J. Biol. Chem. 242, 173 - 181 (1967)

16) COFFEY, R.G., MIDDLETON, E. Jr.: Effects of Glucocorticoids on the Urinary excretion of cyclic AMP and Electrolytes by Asthmatic Children. J. Allergy Clin. Immun. 54, 41 - 53 (1974)

17) COULSON, R.: Metabolism and Excretion of Exogenous Adenosine 3', 5'-Monophosphate and Guanosine 3', 5' Monophosphate. Journ. Biol. Chem. 251, 4958 - 4967 (1976)

18) DINNENDAHL, V.: A Rapid and Simple Procedure for the determination of cGMP by use of the Protein-Binding Method. Nauyn Schm. Arch. Pharm. 284, 55 - 61 (1974)

19) DOHAN, P.H., YAMASHITA, K., LARSEN, R., DAVIS, B., DEFTOS, L., FIELD, J.B.: Urinary c-AMP and parathyroid hormone (PTH) Clin. Res. 19, 474 s.l. (1971)

20) EKINS, R., NEWMAN, B.: Theoretical Aspects of Saturation Analysis. Karolinska Symposia of Research Methods in Reproductive Endocrinology 11 - 36 (1970)

21) FRANKS, D.J., MAC MANUS, J.P.: C-GMP stimulation and inhibition of c-AMP phosphodiesterase from thymic lymphocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 844 - 849 s.l. (1971)

22) GELOT, M., HARTEMANN, P., N ET, P., PAYSANT, P.: Assay of c-AMP by binding Competition. Application to biologic fluids. C.R. Soc. biol. (Paris) 166/11, 1476 - 1481 France (1972)

23) GILMAN, A.G.: A Protein Binding Assay for Adenosine 3', 5'-cyclic Monophosphate. Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 305 - 312 (1970)

24) GOLDBERG, N.D., O'DEA, R.F., HADDOX, M.K.: In: Advances in cyclic nucleotide research. P. GREENGARD and ROBINSON, G.A. Eds. 3, 155 - 223, New York: Raven Press (1973)

25) GOLDBERG, N.D., HADDOX, M.K., ZEILIG, C.E., NICOL, S.E., ACOTT, T.S., GLASS, D.B.: Cyclic GMP, Cyclic AMP and the Yin Yang Hypothesis of Biologic Regulation. The Journal of Investigative Dermatology, 67, 641 - 645 (1976)

26) GORIN, E., BRENNER, T.: Extracellular Metabolism of Cyclic AMP. Biochim. Biophys. Acta, 451, 20 - 28 (1976)

27) GREENGARD, P.: Adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate as a mediator in the action of neurohumoral agents. Biochem. J. 128, 75p - 77p (1972)

28) HAMADAH, K., HOLMES, H., BARKER, G.B., HARTMANN, G.Ç., PARKE, D.V.: Effect of electric convulsion therapy on urinary excretion of 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate. Brit. Med. J. B., 439 - 441 (1972)

29) HAMET, P., KUCHEL, O., FRAYSSE, J., GENEST, J.: Plasma adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate in human hypertension. Canadian Med. Assoc. J. 111/4, 323 - 328 (1974)

30) HAMET, P., KUCHEL, O., GENEST, J.: Effect of upright posture and isoproterenol infusion on cyclic AMP excretion in control subjects and patients with labile hypertension. J. Clin. endocr. 36/2, 218 - 226 Canada (1973)

31) HANDLER, J.S., BUTCHER, R.W., SUTHERLAND, E.W., ORLOFF, J.: The Effect of Vasopression and of Theophylline on the Concentration of Adenosine 3', 5'-Phosphate in the Urinary Bladder of the Toad. J. Biol. Chem. 240, 4524 - 4526 (1965)

32) HANSEN, O.: Blood nucleoside and nucleotide studies in mental disease. Brit. J. Psychiat. 121, 341 - 350 (1972)

33) HARDMAN, J.G., DAVIS, J.W., SUTHERLAND, E.W.: Effects of Some Hormonal and other Factors on the Excretion of Guanosine 3', 5'-Monophosphate and Adenosine 3', 5'-Monophosphate in Rat Urine. Journ. Biol. Chem. 244, 6354 - 6362 (1969)

34) HOROVITZ, Z.P., BEER, B., CLODY, D.E., VOGEL, J.R., CHASIN, M.: Cyclic AMP and anxiety. Psychosomatics 13, 85 - 92 (1972)

35) ILLIANO, G., TELL, G.P.E., SIEGEL, M.I., CUATRECASAS, P.: Guanosine 3', 5'-Cyclic Monophosphate and the Action of Insulin and Acetylcholine. Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2443 - 2447 (1973)

36) JENNER, F.A., SAMPSON, G.A., THOMPSON, E.A., SOMERVILLE, A.R., BEARD, N.A., SMITH, A.A.: Manic-depressive psychosis and urinary excretion of cyclic AMP. Brit. J. Psychiat. 121, 236 - 237 (1972)

37) KLEINE, T.O., KROH, U.: Guanosin-3', 5'-monophosphat und Adenosin-3', 5'-monophosphat im menschlichen Urin-Parameter des Zentralnervensystems. Frühjahrstagung d. Ges. f. Biol. Chemie Regensburg 1977. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 260 - 261 (1977)

38) KLEINE,T.O., KROH,U.: Simultaneous protein-binding assay for guanosine-3',5-monophosphate (Guo-3',5'-P) and adenosine-3',5'-monophosphate (Ado-3',5'-P) of human urine. Jahrestagung d. Dtsch. Ges. f. Klin. Chemie. Aachen 1977, J. Clin. Chem. Biochem. 15,167 (1977)

39) KLEINE,T.O.,KROH, U.: Circadian excretion of guanosine-3',5'-monophosphate and adenosine-3',5'-monophosphate in correlation to electrolyte and protein metabolism of healthy persons. Joint Meeting 1977. Ges. f. Biol. Chemie Freiburg. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 123o (1977)

4o) KLEINE,T.O.,KROH,U., FÜNFGELD,E.W.: Effect of fluphenazine on the circadian excretion of cyclic nucleotides, transmitter metabolites and electrolytes in the urine of chronic schizophrenics. IInd World Congress of Biological Psychiatry. Barcelona 1978

41) KLEINE,T.O., KROH,U.: Time Saving Protein Binding Assay for the Simultaneous Determination of Guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) and Adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) in Human Urine. J.Clin. Chem. Clin. Biochem. 16,657 - 661 (1978)

42) KUCHEL,O.,HAMET,P., CUCHE,J.-L.,TOLIS,G: FRAYSSE; GE Urinary and plasma cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in patients with idiopathic edema.J.Clin. Endocrinol.41/2,282-289 (1974)

43) KUHN,E.,RYSANEK,K.,SPANKOVA,H.,BRODAN, V., BILKOVA,D: Changes in cyclic AMP and dopamine-beta-hydroxylase during sleep deprivation. Activ. nerv. sup. (Praha) 17,4 (1975)

44) KUO,J.F.,GREENGARD,P.:Cyclic Nucleotide-dependent Protein Kinase. VI Isolation and partial purification of a protein Kinase activated by guanosine 3',5'-monophosphate. J. Biol. Chem. 245,2493-2498 (197o)

45) KUO, J.F., LEE, T.P., REYES P.L., WALTON, K.G., DONNELLY, T.E. Jr., GREENGARD,P.: Cyclic nucleotide-dependent protein kinase X. An assay method for the measurement of guanosine 3', 5'-monophosphate in various biological materials and a study of agents regulating its levels in heart and brain. J. Biol. Chem. 247,16-22 (1972)

46) KUO,J.F.,WYATT,G.R.,GREENGARD,P.:Cyclic nucleotide-dependent protein kinases.IX. Partial purification and some properties of GMP-dependent and AMP-dependent protein kinases from various tissues and spezies of Arthropoda. J. Biol. Chem. 246,7159-7167 s.l. (1971)

47) KODAMA, T., MATSUKADO, Y.,SHIMIZU,H.: The cyclic AMP system of the human brain. Brain Res. (Amst.) 5o/1, 135 - 146, Japan (1973)

48) LATNER,A.L.,PRUDHOE,K.: A Simplified Competitive Protein-Binding Assay for Adenosine 3',5'-monophosphate in Plasma. Clin. Chem. Acta 48, 353 -357 (1973)

49) LEBEAU, M.,DUMONT,J.E.,GOLSTEIN,J.:Urinary Cyclic AMP and Cyclic GMP Excretion During the Menstrual Cycle. Horm. Metab.7,19o-194 (1975)

5o) LOSERT,W.: Bedeutung von Adenosin-3',5'-monophosphat für Stoffwechselwirkungen verschiedener Hormone und Pharmaka. Pharmazie 28, 351 - 362 (1973)

51) LOWRY,O.H.,ROSEBROUG,N.J., FARR A.L.,RANDALL,R., Protein measurement with the folin phenol reagent J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

52) MADSEN,S.N., BADAWI,I.,SKOVSTED,L.: A Simple Competitive Protein-Binding Assay for Adenosine-3',5'-Monophosphate in Plasma and Urine. Acta Endocrinol.81,2o8-214 (1975)

53) MIYAMOTO,E.,KUO,J.F.,GREENGARD,P.:Cyclic Nucleotid-dependent Protein Kinases Purification and properties of cAMP-dependent protein Kinase from bovine brain. J. Biol. Chem. 244/23,6395-64o2 (1969)

54) MOHN,G.: Das cyclische 3',5'Adenosinmonophosphat (c-AMP). Arzneimittel-Forsch.22/1o, 1761-1766, BRD (1972)

55) MURAD,F.,GILMAN,A.G.:AMP and GMP: A simultaneous protein binding assay. Biochem. Biophys. Acta 252, 397-4oo s.l. (1971)

56) MURAD,F.,MANGANIELLO AND VAUGHAM,M.: A simple sensprot. binding assay for Guanosine 3',5'-Monophosphate.Proc.Nat. Acad. Sci. US 68,736 (1971)

57) MURAD,F.,PAK,C.Y.C.: Urinary excretion of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'monophosphate. N.Engl. J. Med. 286, 1382-1387 (1972)

58) MURAD,F.,RALL,T.W., VAUGHAM,M.:Conditions for the Formation Partial Purification and Assay of an Inhibitor of Adenosine 3',5'-Monophosphate. Bioch.Biophys.Acta 192,43o-445 (1969)

59) MURAD,F.,WEITZMANN,R.,PAK,C.Y.C.:Urine levels of cyclic AMP and cyclic GMP in parathyroid disorders. Amer. Chem.Soc.Abstr. BIOL. 46 (8/1972)

6o) PAUL, M.I.,CRAMER,H.,BUNNEY,W.E.Jr.: Urinary adenosine 3',5'-monophosphate in the switch process from depression to mania. Science 171,3oo-3o3 (1971)

61) PAUL,M.I.,CRAMER,H.,GODWIN,F.K.: Urinary Cyclic AMP Excretion in Depression and Mania. Arch. gen. Psychiat. 24,327 (1971)

62) POLGAR,P.R.,BELL,M.L.,KELLY,P.,FISCHBEIN J.W.: Determination of urinary cyclic AMP by radioimmunassay. Fed.Proc. 3o,687 (1971)

63) RABINOWITZ,B.,KATZ,J.: Method for determination of c-AMP in plasma. Clin.Chem. 19/3, 312-314, USA (1973)

64) RAIJ,K.,HÄRKÖNEN,M.:Determination of Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate in Urine. Scand. J. clin. hab. Invest.36,161-168 (1976)

65) RAIJ,K.,HÄRKÖNEN.M.,ADLERKREUTZ,H.: A simplified method for the determination of cyclic AMP in urine and tissues. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 27/116,25 (1971)

66) RAIJ,K.,PERHEENTUPA,J.,HÄRKÖNEN,M.:Urinary Cyclic Adenosine Monophosphate Excretion in Diabetes Insipidus of Childhood. Scand.J. Clin.Lab.Invest.34,177-184 (1974)

67) ROCHETTE,C.,CASTAGNA,M:ASimultaneous Protein-Binding Assay for Adenosine 3',5'-Monophosphate and Guanosine-3',5'-Monophosphate in Biological Materials.Biochem. Biophys,Research Comm. 74,1287-1295 (1977)

68) ROBARD,D.,BRIDSON,W.,RAYFORD,P.L.: Rapid calculation of radioimmunoassay results. J.Lab.Clin.Med. 74,77o-78o (1969)

69) ROBINSON,G.A.,COPPEN,A.J.,WHYBROW,P.C. et al.: Cyclic AMP in affective disorders.Lancet 1,1o28-1o29 (197o)

7o) SHAW,J.W.,OLDHAM,S.B.,BETHUNE,J.E., FICHMAN,M.P.: Parathyroid Hormone (PTH)-Mediated Rise in Urinary Cyclic AMP (UcAMP) During Acute Extracellular Fluid (ECF) Expansion Natriuresis in Man. J.Clin. Endocrinol. Metab. 39,311-315 (1974)

71) SUTHERLAND,E.W.:Studies on the mechanism of hormon action. Science 177/4o47,4o1-4o8 USA (1972)

72) SY,J.,RICHTER,D.: Separation of a cyclic 3',5'-adenosine monophosphate binding protein from yeast. Biochemistry 11, 2784-2787 (1972)

73) SCHIMMER,B.P.: Effects of catecholamines and monovalent cations on adenylate cyclase activity in culturell glial tumor cells. Biochim. Biophys. Acta 252,567-573 (1971)

74) SCHULTZ,G.,HARDMAN,J.G.,SCHULTZ,K.,BAIRD, L.E., SUTHERLAND, A.W.: The Importance of Calcium Ions for the Regulation of Guanosine 3', 5'-Cyclic Monophosphate Levels. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 7o 3889-3893 (1973)

81) TAYLOR, A.L., DAVIS, B.B., PAWLSON, L.G. et al: Factors Influencing the Urinary Excretion of 3',5'-Adenosine Monophosphate in Humans. J. clin. Endocrinol. Metab. 30, 316-324 (1970)

82) TOMLINSON, S., BARLING, P.M., ALBANO, J.D.M., BROWN, B.L., O'RIORDAN, J.L.H.: The Effects of Exogenous Parathyroid Hormone on Plasma and Urinary Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate in Man. Clin. Sci. Molec. Med. 47, 481-492 (1974)

83) TOVEY, K.C., OLDHAM, K.G., WHELAN, J.A.M.: A simple direct assay for cyclic AMP in Plasma and other biological samples using an improved competitive protein binding technique. Clinica Chimica Acta 56, 221-234 (1974)

84) VITEK, V., GILL, CONN, A., LANG, D.J., COWLEY, R.A.: The Effect of severe Trauma on Urinary Cyclic AMP in Children of Different Ages. Clin. Chim. Acta 70, 227-237 (1976)

85) WALSH, D.A., PERKINS, J.P., KREBS, E.G.: An Adenosine 3',5'-Monophosphate-dependant Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle. The Journal of Biological Chemistry, 234, 3763-3774 (1968)

86) WALTON, G.M., GARREN, L.D.: An Assay for Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate Based on the Association of the Nucleotide with a Partially Purified Binding Protein. Biochemistry, 9, 4223-4229 (1970)

75) SCHWARTZ, H.J., WHITE, L.W.: Urinary and plasma c-AMP responses to epinephrine in asthmatic and normal subjects. J. Allergy Clin. immunol. 51/2 88-89, USA (1973)

76) STEINER, A.L., PAGLIARA, A.S., CHASE, L.R., KIPNIS, D.M.: Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. I, II Adenosine 3',5'-MP and c-GMP in mammalian tissues and body-fluids; III. J. Biol. Chem. 247, 1114-1120, 1107-1124 (1972)

77) STONE, J.F., POLK, M.I., DOBBS, J.W., GRAHAM, M.E., SCHEVING, L.E., KANABROCKI, E.L.: Circadian Variation in Human Urinary Cyclic AMP and the Effect of Different Diets on this Rhythm. Int. J. Chronobiol. 2, 163-170 (1974)

78) TOANG, C.P.W., LEHOTAY, D.C., MURPHY, B.E.P.: Competitive Binding Assay for Adenosine 3', 5'- Monophosphate Employing a Bovine Adrenal Protein: Application to Urine, Plasma and Tissues. J. Clin. Endocrin. Metabol. 35, 809 (1972)

79) TAKAHASHI, K.: Effects of Vasopressin, waterload and aminophylline on adenosine 3',5'-phosphate in human urine. Kobe J. med. sci. 17/1, 17-33 Japan (1971)

80) TAKAHASHI, K., KAMIMURA, M., SHINKO, F. et al.: Effects of vasopressin and waterload on urinary cAMP. Lancet 2, 967 (1966)

87) WELLER, M., RODNIGHT, R., CARRERA, D.: Determination of Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate in Cerebral Tissues by Saturation Analysis. Biochem. J. 129, 113-121 (1972)

88) WHITE, A.A., ZENSER, T.V.: Separation of 3',5'-nucleoside monophosphates from other nucleotides on aluminium oxide colums. Analyt. Biochem. 41, 372-396 (1971)

89) WHITFIELD, J.F., MacMANUS, J.P., FRANKS, D.J., GILLAN, D.J., YOUDALE, T.: The possible mediation by cyclic AMP of the stimulation of thymocyte proliferation by c-GMP. Proc. soc. exp. Biol. Med. 137, 453-457, s.l. (1971)

90) WUNDERWALD, P., JURZ, G., MICHAL, G.: Assay of Cyclic AMP by an Isotope Dilution Test with Binding Protein. Analytical Biochemistry 59, 468-481 (1974)

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Kleine, für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Geräte und Substanzen sowie für seine zuvorkommende Hilfsbereitschaft und seine jederzeit aktive Unterstützung.

Weiter danke ich Herrn Prof. Dr. Solcher für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Nicht zuletzt möchte ich den Mitarbeitern des Forschungs,-und Routinelabors der Nervenklinik Marburg, insbesondere Herrn Merten, an dieser Stelle herzlich danken.

LEBENSLAUF

Ich, Udo Kroh, wurde am 29. Mai 1951 als älterer von zwei Söhnen des Justizvollzugsbeamten Franz Kroh und seiner Frau Olga, geb. Fälchle, in Ziegenhain, Hessen, geboren. Nach Volksschulbesuch von 4 Jahren in Marburg und Ziegenhain wechselte ich 1961 zum Schwalmgymnasium in Treysa, wo ich am 11. 6. 69 die Reifeprüfung am naturwissenschaftlichen Zweig ablegte. Anschließend studierte ich zunächst ein Semester Physik in Gießen und begann mein Medizinstudium 197o in Frankfurt.Dort bestand ich 1971 und 1973 die naturwissenschaftliche und die ärztliche Vorprüfung und ging 1974 nach Marburg. Hier legte ich im Dezember 1976 das Staatsexamen ab. Seither arbeite ich nach Medizinalassistentenzeit in Marburg und Siegen seit der Approbation als Arzt 1977 zuerst als chirurgischer Assistent in Siegen und jetzt als wissenschaftlicher Assistent in Marburg in der Anaethesie.

Seit dem 12. 5. 1978 bin ich mit meiner Frau Ute, geb. Schäfer, verheiratet.

Die Experimente zu vorliegender Arbeit begann ich Ende 1974. Nach Unterbrechung durch das Staatsexamen und einigen Publikationen, in denen ich als Coautor erschien, wurde sie Anfang 1977 abgeschlossen.

Cappel, 29. 11. 78

Udo Kroh

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

In Frankfurt: Amthor, Antoni, Bochnik, Chandra, Deppe, Fröhlich, Förster, Greven, Groß, Groß, Hauk, Heinz, Hövels, Hohorst, Hübner, Kaltenbach, Klima, Lötschert, Mann, Meier-Sydow, Nasemann, Offenbach, Pirlet, Richter, Ried, Rosenstock, Schmidt, Schmidt-Matthiesen, Schmitt-Neuroth, Schneider, Schöffling, Siede, Sigusch, Starck, Vonderschmitt, Woenckhaus;
in Marburg: Amon, Baltzer, Bode, Buchholz, Daume, Dittrich, Dombrowsky, Doss, Egbring, Eißner, Eschenbach, Exner, Friedrich, Gerdes, Goßmann, Grundner, Hamelmann, Hardewig, Havemann, Heene, Hilgermann, Hort, Huch, Jakob, Kaffarnik, Klaus, Kleine, Kleinsasser, Knauff, Koransky, Kuni, Lange, Linneweh, Lütcke, Mannheim, Maroske, Martini, Massarat, Neurath, Niemeyer, Pohlen, Pots, Riecken, Rodeck, Rupec, Schmitz-Moormann, Schulte-Hermann, Siegert, Sodomann, Solcher, Straub, Stutte, Welge-Lüßen, Willenbockel.